

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



TESIS DOCTORAL

**Autohidrólisis y deslignificación organosolv de madera de
Pinus radiata para la recuperación de hemicelulosas y
lignina con aprovechamiento de la fracción celulósica por
vía enzimática**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Tamara María Santos Meneses

DIRECTORES

Mercedes Oliet Palá
María Virginia Alonso Rubio

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Ingeniería Química



**Autohidrólisis y deslignificación organosolv de madera de
Pinus radiata para la recuperación de hemicelulosas y lignina con
aprovechamiento de la fracción celulósica por vía enzimática**

MEMORIA

que para optar al Título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid
en el Programa de Doctorado de Ingeniería Química presenta

Tamara M^a Santos Meneses

Directoras:

Mercedes Oliet Palá y M^a Virginia Alonso Rubio

Madrid, 2017

D^a Mercedes Olier Palá y D^a M^a Virginia Alonso Rubio, Profesoras Titulares del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN: que el presente trabajo de investigación titulado “Autohidrólisis y deslignificación organosolv de madera de *Pinus radiata* para la recuperación de hemicelulosas y lignina con aprovechamiento de la fracción celulósica por vía enzimática” constituye la memoria que presenta Tamara M^a Santos Meneses para optar al grado de doctor, que ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química bajo su dirección.

Para que conste a todos los efectos oportunos, se firma el presente certificado en Madrid, Abril de 2017.

Mercedes Olier Palá

M^a Virginia Alonso Rubio

A mi padre

En estas líneas quiero mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de alguna u otra manera, han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar me gustaría expresar mi gratitud hacia mis directoras, Mercedes Oliet Palá y Virginia Alonso Rubio, por la comprensión que han tenido estos años con mi situación y la confianza que siempre han demostrado en mí. Su conocimiento y dedicación han sido fundamentales en mi aprendizaje y en el desarrollo de este trabajo. Asimismo, agradecer a Francisco Rodríguez Somolinos la gran oportunidad que me ha dado de pertenecer a este grupo de investigación y de poder realizar esta Tesis Doctoral.

La investigación desarrollada se ha financiado a través del proyecto CTQ2013-42006-R, de ahí mi agradecimiento al Ministerio de economía, industria y competitividad, organismo en el que se enmarca dicho proyecto.

Quiero también expresar mi gratitud a Dupont, a través de Dr. Sharief Barends, por su colaboración en esta investigación por el suministro de sus enzimas y su asesoramiento. Así como al Centro de Investigación Forestal perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CIFOR-INIA) por el suministro de la biomasa, en especial, a José María Carbajo por la ayuda que me ha prestado.

No quiero olvidarme de los otros profesores del grupo de investigación, Julián García y Juan Carlos Domínguez, especialmente a este último, por haber estado siempre dispuesto a echarme una mano.

Durante estos años he tenido unos compañeros de laboratorio excepcionales, a los que quiero tener presentes en estos agradecimientos. A Ana, por acompañarme en los primeros pasos en el mundo de la biorrefinería y por enseñarme que, aunque al principio no sea fácil, con trabajo y constancia se puede conseguir. A mi otra compañera de línea, Vicky, por todo lo que ha hecho por mí en estos años, dentro y fuera del laboratorio, y que resulta muy difícil de plasmar en estas líneas. No puedo olvidarme de Marimar, por haberme enseñado el lado positivo cuando más lo necesitaba y por mostrarme el camino para encontrarlo. A Marcos y Pablo, por todos los buenos consejos que me han dado y los ratos que hemos pasado juntos. Tampoco quisiera olvidarme del resto de compañeros que han estado presentes a lo largo de esta etapa y que siempre han estado dispuestos a ayudarme, Ester, Belén, María, Emilio y Noemí.

Agradecer a Javi, Carlos, Marta y Patricia su contribución en la parte experimental del trabajo y por la oportunidad de aprender con ellos más allá de la investigación.

Por último, dar las gracias a mi familia y a mis amigos, por la paciencia que han tenido y por el tiempo que les he robado para dedicárselo a la tesis. A mi madre, por enseñarme lo que significa la capacidad de esfuerzo, trabajo y superación; sin ella, no hubiera llegado a ser la persona que soy. A mi padre, por estar orgulloso de mí y confiar en que lo iba a conseguir. De alguna forma, sé que estás conmigo compartiendo este momento. A mi hermana Tatiana y a mi abuela Cecilia, por ser pilares fundamentales en mi vida y estar siempre pendientes para que esté bien. También agradecer a mi “otra” familia su apoyo y su cariño, especialmente a Jorge por sus consejos.

A Santiago, unas palabras son insuficientes para expresar lo que has hecho por mí. Gracias por estar ahí siempre, por compartir los buenos y los malos momentos, por apoyarme y creer en mí.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. ABSTRACT/RESUMEN	1
2. LA BIORREFINERÍA	11
2.1. Clasificación de las biorrefinerías	15
2.2. Biorrefinerías de materiales lignocelulósicos	19
2.2.1. Plataformas procedentes de materiales lignocelulósicos	19
2.2.2. Productos procedentes de materiales lignocelulósicos.....	22
2.2.2.1. Bioproductos de materiales lignocelulósicos	23
2.2.2.2. Bioenergía de materiales lignocelulósicos	24
2.3. La madera como material lignocelulósico	28
2.3.1. Tipos de madera	28
2.3.2. Composición de la madera	31

2.3.2.1. Celulosa.....	32
2.3.2.2. Hemicelulosa.....	33
2.3.2.3. Lignina	35
2.3.2.4. Extractos y cenizas.....	38
2.3.3. Madera de <i>Pinus radiata</i>	39
3. PRETRATAMIENTOS DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS.....	41
3.1. Pretratamientos físicos.....	45
3.1.1. Pretratamiento mecánico.....	46
3.1.2. Pretratamiento por irradiación	46
3.2. Pretratamientos químicos.....	46
3.2.1. Pretratamiento alcalino.....	47
3.2.2. Pretratamiento ácido.....	47
3.2.3. Pretratamiento con líquidos iónicos	48
3.2.4. Organosolv	48
3.2.5. Deslignificación oxidativa	49
3.3. Pretratamientos físicos-químicos	50
3.3.1. Explosión con vapor.....	50
3.3.2. Autohidrólisis	50
3.3.3. Explosión de CO ₂	51
3.3.4. Pretratamiento con amoníaco	51
3.4. Pretratamientos biológicos.....	52
3.5. Selección y justificación de pretratamientos.....	52
3.6. La autohidrólisis como pretratamiento.....	54
3.6.1. Autohidrólisis como proceso de pre-extracción	58
3.6.2. Métodos de purificación y separación de hemicelulosas	60
3.6.3. Aprovechamiento de las hemicelulosas extraídas.....	60
3.7. Pretratamiento organosolv.....	61
3.7.1. Reacciones de deslignificación	63
3.7.2. Procesos organosolv como pretratamiento a escala planta piloto.....	65
3.7.2.1. Proceso CIMV	66
3.7.2.2. Proceso ECN.....	67

3.7.2.3. Fraunhofer CBP	68
3.7.3. Aplicaciones de la lignina organosolv	69
3.7.3.1. Formulación de espumas de poliuretano y resinas fenólicas	69
3.7.3.2. Relleno en films de ácido poliláctico	70
3.7.3.3. Producción de fibras de carbono.....	70
3.7.3.4. Agentes antioxidantes y agentes antimicrobianos	71
3.8. Pretratamientos combinados	71
3.8.1. Secuencias con pretratamiento ácido	74
3.8.2. Secuencias con autohidrólisis	74
3.8.3. Secuencias con explosión con vapor.....	75
3.8.4. Secuencias con tratamiento biológico.....	75
3.8.5. Secuencia autohidrólisis-organosolv	76
 4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	79
4.1. Propiedades físico-químicas del sustrato	81
4.1.1. Cristalinidad	82
4.1.2. Accesibilidad.....	82
4.1.3. Composición	84
4.1.4. Productos de degradación	86
4.2. Celulasas.....	87
4.2.1. Complejos enzimáticos.....	88
4.2.2. Adsorción y desorción de la enzima	89
4.3. Factores que influyen en la hidrólisis enzimática.....	89
4.3.1. Cargas de enzima y de sustrato	90
4.3.2. Secado del sustrato.....	90
4.3.3. Surfactantes y aditivos.....	91
 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	93
5.1. Planteamiento experimental.....	96
5.2. Diseño de experimentos y análisis estadístico	99
5.3. Fraccionamiento de madera de pino	103

5.3.1. Materiales y reactivos	104
5.3.2. Equipo de reacción	105
5.3.3. Autohidrólisis	107
5.3.4. Proceso organosolv	109
5.3.5. Secuencia de tratamientos autohidrólisis-organosolv.....	112
5.4. Caracterización de la fase líquida	115
5.4.1. Determinación del pH	115
5.4.2. Cuantificación de los azúcares y los productos de degradación	115
5.5. Caracterización del sólido tratado	119
5.5.1. Cuantificación de sólidos	119
5.5.2. Composición en carbohidratos y lignina	119
5.5.3. Estabilidad térmica.....	122
5.5.4. Grupos funcionales	124
5.6. Caracterización de la lignina organosolv	126
5.6.1. Distribución de pesos moleculares	127
5.6.2. Parámetros térmicos.....	130
5.7. Hidrólisis enzimática	131
5.7.1. Reactivos y equipo experimental de hidrólisis	131
5.7.2. Caracterización de la enzima	132
5.7.3. Procedimiento operativo de hidrólisis	133
5.7.4. Cuantificación de la glucosa	134
6. AUTOHIDRÓLISIS. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	137
6.1. Caracterización de la madera autohidrolizada	140
6.1.1. Determinación gravimétrica	140
6.1.2. Composición	144
6.1.2.1. Celulosa.....	145
6.1.2.2. Hemicelulosas	148
6.1.2.3. Lignina	154
6.1.3. Estabilidad térmica.....	159
6.1.4. Grupos funcionales	165
6.2. Caracterización de la fase líquida de la autohidrólisis.....	169

6.2.1. Determinación del pH	169
6.2.2. Composición	174
6.2.2.1. Oligosacáridos	174
6.2.2.2. Monosacáridos.....	176
6.2.2.3. Productos de degradación	179
6.3. Selección de las condiciones del tratamiento de autohidrólisis	183
 7. PROCESO ORGANOSOLV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	185
 7.1. Caracterización del sólido deslignificado.....	188
7.1.1. Porcentaje de sólido tratado	188
7.1.2. Contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina.....	194
7.1.2.1. Celulosa	195
7.1.2.2. Hemicelulosas.....	201
7.1.2.3. Lignina	207
7.1.3. Estabilidad térmica	214
7.1.4. Grupos funcionales	221
7.2. Caracterización de la lejía negra organosolv	224
7.2.1. Determinación del pH	224
7.2.2. Contenido de azúcares y productos de degradación.....	229
7.3. Caracterización de la lignina organosolv.....	233
7.3.1. Cuantificación.....	233
7.3.2. Distribución de pesos moleculares	238
7.3.3. Estabilidad térmica	241
7.4. Selección de las condiciones favorables del proceso organosolv	250
 8. TRATAMIENTO SECUENCIAL AUTOHIDRÓLISIS-ORGANOSOLV.	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	253
 8.1. Caracterización de la fase sólida	256
8.1.1. Análisis gravimétrico.....	256
8.1.2. Composición	261
8.1.3. Estabilidad térmica	266

8.1.4. Grupos funcionales	270
8.2. Caracterización de la lejía negra organosolv	273
8.2.1. Determinación del pH	273
8.2.2. Composición	274
8.3. Caracterización de la lignina organosolv	277
8.3.1. Cuantificación	278
8.3.2. Distribución de pesos moleculares	279
8.3.3. Estabilidad térmica.....	282
9. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	287
9.1. Cuantificación de proteínas	290
9.2. Rendimiento de la hidrólisis	290
9.3. Comparación con otros materiales.....	295
9.4. Selección de la secuencia de tratamientos autohidrólisis-organosolv	297
10. CONCLUSIONES	301
11. NOMENCLATURA	307
12. BIBLIOGRAFÍA	315
ANEXOS.....	339

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Plantas piloto y demostración de bioetanol lignocelulósico (datos de IEA)..	27
Tabla 2.2. Composición de maderas duras y blandas (Windeisen y Wegener, 2009). ...	31
Tabla 2.3. Tipos de polisacáridos presentes en las hemicelulosas (Peng y col., 2012)....	34
Tabla 2.4. Proporción de tipos de enlaces en maderas blandas (Chakar y Ragauskas, 2004).	37
Tabla 2.5. Composición de <i>Pinus radiata</i> (datos de NREL).....	39
Tabla 3.1. Ventajas y desventajas de los diferentes pretratamientos (Sun y col., 2016) .	53
Tabla 3.2. Procesos organosolv con ácidos orgánicos como pretratamiento (Wang y col., 2011; Cui y col., 2014; Vila y col., 2014; Chen y col., 2015; Zhang y col., 2016a).....	62
Tabla 3.3. Plantas piloto de procesos organosolv.	66
Tabla 3.4. Secuencia de pretratamientos para materiales lignocelulósicos.....	73
Tabla 5.1. Reactivos empleados en los ensayos experimentales.....	104
Tabla 5.2. Variables y niveles de operación en la autohidrólisis.	108

Tabla 5.3. Diseño de experimentos para la autohidrólisis.	108
Tabla 5.4. Variables y niveles de operación en el proceso organosolv.	110
Tabla 5.5. Diseño de experimentos para el proceso organosolv.	111
Tabla 5.6. Condiciones experimentales de la secuencia autohidrólisis-organosolv.	114
Tabla 5.7. Patrones usados para los calibrados de HPLC.	116
Tabla 5.8. Características y condiciones empleadas en las columnas de HPLC.	117
Tabla 5.9. Condiciones de operación en los análisis termogravimétricos.	123
Tabla 5.10. Bandas características de los espectros FTIR para materiales lignocelulósicos (Pandey, 1999; Colom y col., 2003; Schwanninger y col., 2004).	126
Tabla 5.11. Condiciones de medida en GPC.	128
Tabla 5.12. Patrones EasiVial PS-H para el calibrado de GPC.	129
Tabla 5.13. Condiciones de operación en los análisis termogravimétricos de lignina.	130
Tabla 5.14. Reactivos empleados en la hidrólisis enzimática.	132
Tabla 5.15. Características de operación de hidrólisis enzimática.	134
Tabla 6.1. Porcentaje de sólidos tras la autohidrólisis.	140
Tabla 6.2. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre ST_{AH}	141
Tabla 6.3. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre ST_{AH}	141
Tabla 6.4. Contenido en carbohidratos y lignina de la madera autohidrolizada expresado en g/100 g de madera autohidrolizada.	144
Tabla 6.5. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre C_{AH}	145
Tabla 6.6. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre C_{AH}	145
Tabla 6.7. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre X_{AH} , Ga_{AH} y M_{AH}	148
Tabla 6.8. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre X_{AH} , Ga_{AH} y M_{AH}	149
Tabla 6.9. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre LI_{AH}	154
Tabla 6.10. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre LI_{AH}	155
Tabla 6.11. Parámetros de degradación térmica de la madera autohidrolizada.	159
Tabla 6.12. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre $T_{10\% - AH}$	160
Tabla 6.13. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre $T_{10\% - AH}$	160
Tabla 6.14. Análisis semicuantitativo FTIR. Banda referencia $R_1 = 1426\text{ cm}^{-1}$	167
Tabla 6.15. Análisis semicuantitativo FTIR. Banda referencia $R_2 = 1512\text{ cm}^{-1}$	168
Tabla 6.16. Valores del pH de la fase líquida de la autohidrólisis.	169

Tabla 6.17. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre pH_{AH}	170
Tabla 6.18. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre pH_{AH}	170
Tabla 6.19. Concentración de los oligosacáridos en la fase líquida de autohidrólisis (g/L).	174
Tabla 6.20. Concentración de los monosacáridos en la fase líquida de autohidrólisis (g/L).	176
Tabla 6.21. Concentración de los productos de degradación en la fase líquida de autohidrólisis (g/L).	179
Tabla 7.1. Sólidos tratados obtenidos en el organosolv.	189
Tabla 7.2. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre ST_{ORG}	189
Tabla 7.3. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre ST_{ORG}	190
Tabla 7.4. Contenido en carbohidratos y lignina del sólido deslignificado expresado en g/100 g de sólido deslignificado.	195
Tabla 7.5. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre C_{ORG}	196
Tabla 7.6. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre C_{ORG}	196
Tabla 7.7. Valor y análisis de varianza de los efectos significativos sobre C_{ORG}	197
Tabla 7.8. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre HMC_{ORG}	201
Tabla 7.9. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre HMC_{ORG}	202
Tabla 7.10. Valor y análisis de varianza de los efectos significativos sobre HMC_{ORG}	202
Tabla 7.11. Grado de deslignificación de los sólidos tratados del diseño organosolv.	207
Tabla 7.12. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre GD.	208
Tabla 7.13. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre GD.	208
Tabla 7.14. Valor y análisis de varianza de los efectos significativos sobre GD.	209
Tabla 7.15. Parámetros de degradación térmica del sólido deslignificado.	214
Tabla 7.16. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre $T_{10 \% -ORG}$	215
Tabla 7.17. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre $T_{10 \% -ORG}$	216
Tabla 7.18. Valor y análisis de varianza de los efectos significativos sobre $T_{10 \% -ORG}$. ..	216
Tabla 7.19. Análisis semicuantitativo FTIR de los sólidos deslignificados.	223
Tabla 7.20. Valores de pH de la lejía negra del organosolv.	224
Tabla 7.21. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre pH_{ORG}	225
Tabla 7.22. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre pH_{ORG}	225

Tabla 7.23. Concentración de monosacáridos y productos de degradación de la lejía negra de los ensayos del diseño organosolv (g/L).....	229
Tabla 7.24. Resultados de la lignina organosolv precipitada.....	233
Tabla 7.25. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre R _{LP-ORG}	235
Tabla 7.26. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre R _{LP-ORG}	235
Tabla 7.27. Parámetros obtenidos por GPC de la lignina organosolv.....	238
Tabla 7.28. Parámetros de degradación térmica de la lignina organosolv.....	245
Tabla 7.29. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre T _{25 %} de la lignina organosolv.	245
Tabla 7.30. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre T _{25 %} de la lignina organosolv.....	246
Tabla 7.31. Validación de los modelos en las condiciones favorables del proceso organosolv.....	251
Tabla 8.1. Parámetros de degradación térmica de los sólidos procedentes de los procesos organosolv y procesos secuenciales.	266
Tabla 8.2. Análisis semicuantitativo FTIR de los sólidos obtenidos en los procesos organosolv y procesos secuenciales.....	272
Tabla 8.3. Valores del pH de la lejía negra de los procesos organosolv y procesos secuenciales.	273
Tabla 8.4. Concentración de compuestos en la lejía negra de los procesos organosolv y procesos secuenciales (g/L).	275
Tabla 8.5. Parámetros obtenidos por GPC de la lignina precipitada en los procesos organosolv y procesos secuenciales.....	279
Tabla 9.1. Rendimientos de hidrólisis enzimática de distintas materias primas en la secuencia de tratamientos autohidrólisis-organosolv.....	296
Tabla 9.2. Parámetros para el estudio de los tratamientos secuenciales.....	297
Tabla 9.3. Fracciones recuperadas en los tratamientos secuenciales (g/100 g de madera).	299

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema de biorrefinería por NREL.....	14
Figura 2.2. Esquema genérico de biorrefinería (Cherubini y col., 2009).....	18
Figura 2.3. Esquema de biorrefinería con tres plataformas y tres productos usando madera como materia prima (de Jong y Jungmeier, 2015).....	18
Figura 2.4. Plataformas químicas procedentes de materiales lignocelulósicos (Isikgor y Becer, 2015).....	20
Figura 2.5. Distribución de la biomasa según aplicación (Scarlat y col., 2015).....	22
Figura 2.6. Esquema del proceso de obtención del etanol celulósico.	25
Figura 2.7. Configuraciones posibles para producción de bioetanol (Ojeda y col., 2011).	26
Figura 2.8. a) Modelo de pared celular y b) Sección transversal (Schwarze, 2007).....	29
Figura 2.9. Disposición de celulosa, hemicelulosa y lignina en la pared celular de materiales lignocelulósicos (Doherty y col., 2011).....	30
Figura 2.10. Punteaduras en maderas blandas (Keey, 2005).....	30

Figura 2.11. Componentes de la madera (Mohan y col., 2006).	31
Figura 2.12. Estructura de la celulosa (Windeisen y Wegener, 2009).....	32
Figura 2.13. Estructura molecular de la celulosa con extremos reductor y no reductor (Trache y col., 2016).....	33
Figura 2.14. Glucomanano presente en maderas blandas (Windeisen y Wegener, 2009).	34
Figura 2.15. Xilano presente en maderas duras (Windeisen y Wegener, 2009).....	35
Figura 2.16. Estructura de la lignina de madera blanda (Windeisen y Wegener, 2009). 36	
Figura 2.17. Precursores de la lignina: a) Alcohol p-cumarílico, b) Alcohol coniferílico y c) Alcohol sinapílico (Doherty y col., 2011).	37
Figura 2.18. Uniones entre unidades de fenilpropano en la lignina (Sjöström, 1981; Chakar y Ragauskas, 2004).....	38
Figura 3.1. Esquema de pretratamiento (Kumar y col., 2009).	44
Figura 3.2. Esquema de pretratamientos para materiales lignocelulósicos.	45
Figura 3.3. Modo de operación en pretratamientos hidrotérmicos: a) Isotermo y b) No isotermo (Ruiz y col., 2013).	54
Figura 3.4. Esquema de degradación de celulosa y hemicelulosas de madera blanda (Adaptado de Marziahetti y col., 2008).	56
Figura 3.5. Esquema de reacción de la lignina en medios ácidos (Pielhop y col., 2015). 58	
Figura 3.6. Formación del carbocatión bencílico por la rotura del enlace α -aril éter.....	63
Figura 3.7. Formación del éter enólico a partir del carbocatión bencílico: a) Eliminación del protón y b) Eliminación del grupo hidrometoxilo.	64
Figura 3.8. Rotura del enlace β -O-4 con la formación de cetona en posición β	64
Figura 3.9. Cetonas de Hibbert.	64
Figura 3.10. Rotura del enlace β -O-4 con la formación del estilbeno.....	65
Figura 3.11. Reacción de repolimerización por adición nucleófila.....	65
Figura 3.12. Esquema del proceso CIMV (Adaptado de Snelders y col., 2014a).....	67
Figura 3.13. Esquema de la planta (Adaptado de Laure y col., 2014).	68
Figura 3.14. Esquema de pretratamientos combinados (Sun y col., 2016).	72
Figura 4.1. Esquema simplificado de la hidrólisis enzimática de la celulosa (Adaptado de Ratanakhanokchai y col., 2013).	87
Figura 5.1. Esquema del planteamiento experimental.	98

Figura 5.2. Disposición de experimentos en diseño compuesto central 2^2 con tres puntos centrales y cuatro puntos estrellas.....	100
Figura 5.3. Disposición de experimentos en diseño compuesto central 2^3 con tres puntos centrales y seis puntos estrellas.	100
Figura 5.4. Reactor discontinuo a presión.....	106
Figura 5.5. Esquema de la rampa de temperatura en reactor.	107
Figura 5.6. Esquema de la autohidrólisis.	109
Figura 5.7. Esquema del proceso organosolv.	112
Figura 5.8. Esquema del pretratamiento secuencial autohidrólisis-organosolv.	113
Figura 5.9. Esquema de HPLC.....	117
Figura 5.10. Esquema de caracterización de la madera de pino y sólidos tratados (Norma NREL/TP-510-42618).....	120
Figura 5.11. Esquema de una termobalanza de TGA (suministrado por Mettler-Toledo).	123
Figura 5.12. Curva y derivada de TGA de madera de pino.	124
Figura 5.13. Curva de calibrado de GPC.....	129
Figura 5.14. Incubador IKA modelo KS 4000 i.	132
Figura 5.15. Esquema de la hidrólisis enzimática.....	133
Figura 6.1. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para ST_{AH} (%). .	142
Figura 6.2. Mapa de contorno de ST_{AH} (%).	143
Figura 6.3. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para C_{AH} (%)...	146
Figura 6.4. Mapa de contorno de C_{AH} (%).	147
Figura 6.5. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para la hemicelulosa en la madera autohidrolizada: a) X_{AH} (%), b) Ga_{AH} (%) y c) M_{AH} (%). ...	151
Figura 6.6. Mapa de contorno de la hemicelulosa en la madera autohidrolizada: a) X_{AH} (%), b) Ga_{AH} (%) y c) M_{AH} (%).	152
Figura 6.7. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para LI_{AH} (%)...	156
Figura 6.8. Mapa de contorno de LI_{AH} (%).	156
Figura 6.9. Tonalidades obtenidas en la fase sólida del diseño de autohidrólisis.	158
Figura 6.10. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para $T_{10\% - AH}$ (°C).	161
Figura 6.11. Mapa de contorno de $T_{10\% - AH}$ (°C).	162

Figura 6.12. Curvas de TGA y DTG de la fase sólida de los ensayos AH-3, AH-8 y AH-11 del diseño de autohidrólisis.	163
Figura 6.13. $T_{10\% \text{-AH}}$ (°C) frente al contenido en hemicelulosas (%) en la madera autohidrolizada.....	165
Figura 6.14. Espectros de FTIR de las fases sólidas del diseño (AH-3, AH-8 y AH-11) y madera de pino.....	166
Figura 6.15. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para pH_{AH}	171
Figura 6.16. Mapa de contorno de pH_{AH}	172
Figura 6.17. Relación entre ST_{AH} (%) y pH_{AH}	173
Figura 6.18. Concentración de oligosacáridos totales (g/L) frente al factor de severidad (S_0) del tratamiento de autohidrólisis.	175
Figura 6.19. Concentración de pentosas y hexosas (g/L) frente al factor de severidad (S_0) del tratamiento de autohidrólisis.	178
Figura 6.20. Concentración de productos de degradación (g/L) frente al factor de severidad (S_0) del tratamiento de autohidrólisis.....	180
Figura 6.21. Productos de degradación en la fase líquida de autohidrólisis.....	181
Figura 6.22. Tonalidades obtenidas en la fase líquida del diseño de autohidrólisis.....	182
Figura 7.1. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para ST_{ORG} (%). 191	
Figura 7.2. Mapa de contorno de ST_{ORG} (%): a) $C_{EtOH} = 50\%$, b) $t = 75$ min y c) $T = 185$ °C.....	192
Figura 7.3. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para C_{ORG} (%). . 198	
Figura 7.4. Mapa de contorno de C_{ORG} (%): a) $C_{EtOH} = 50\%$, b) $t = 75$ min y c) $T = 185$ °C.	199
Figura 7.5. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para HMC_{ORG} (%).	203
Figura 7.6. Mapa de contorno de HMC_{ORG} (%): a) $C_{EtOH} = 50\%$, b) $t = 75$ min y c) $T = 185$ °C.	204
Figura 7.7. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para GD (%).	210
Figura 7.8. Mapa de contorno de GD (%): a) $C_{EtOH} = 50\%$, b) $t = 75$ min y c) $T = 185$ °C.	211
Figura 7.9. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para $T_{10\% \text{-ORG}}$ (°C).	217
Figura 7.10. Mapa de contorno de $T_{10\% \text{-ORG}}$ (°C): a) $C_{EtOH} = 50\%$, b) $t = 75$ min y c) $T = 185$ °C.....	218

Figura 7.11. Curvas de TGA y DTG del sólido deslignificado de los ensayos ORG-10, ORG-13, ORG-15 y ORG-17 del diseño organosolv.	220
Figura 7.12. $T_{10\% \text{-ORG}}$ (°C) frente al contenido en hemicelulosa y lignina (%) en el sólido deslignificado.....	221
Figura 7.13. Espectros de FTIR de los sólidos deslignificados del diseño organosolv: ORG-4, ORG-13, ORG-14 y ORG-15.....	222
Figura 7.14. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para pH_{ORG}	226
Figura 7.15. Mapa de contorno de pH_{ORG} : a) $C_{\text{EtOH}} = 50\%$, b) $t = 75 \text{ min}$ y c) $T = 185^\circ\text{C}$	227
Figura 7.16. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para $R_{\text{LP-ORG}}$ (%).	236
Figura 7.17. Mapa de contorno de la $R_{\text{LP-ORG}}$ (%): a) $C_{\text{EtOH}} = 50\%$ y b) $t = 75 \text{ min}$	237
Figura 7.18. Distribución de pesos moleculares de la lignina organosolv de los experimentos ORG-4 y ORG-13.	239
Figura 7.19. Curvas de TGA y DTG de las ligninas organosolv obtenidas a condiciones severas y suaves a diferentes porcentajes de etanol: a) 40% y b) 60%	242
Figura 7.20. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para $T_{25\%}$ de la lignina organosolv.....	247
Figura 7.21. Mapa de contorno de $T_{25\%}$ de la lignina organosolv (°C): a) $C_{\text{EtOH}} = 50\%$, b) $t = 75 \text{ min}$ y c) $T = 185^\circ\text{C}$	248
Figura 8.1: a) Sólidos tratados de la etapa organosolv referidos a la madera introducida a la etapa (%) y b) Sólidos tras el proceso secuencial referidos a 100 g de madera de pino.....	257
Figura 8.2. Composición de los sólidos tratados tras los procesos organosolv y procesos secuenciales: a) Organosolv autocatalítico y b) Organosolv ácido.	261
Figura 8.3. Grado de deslignificación (%) frente al factor de severidad de la autohidrólisis (S_0).	263
Figura 8.4. Grado de deslignificación (%) frente a sólidos tratados en la etapa organosolv (%).	264
Figura 8.5. Tonalidades de los sólidos de los procesos organosolv y los procesos secuenciales.	265
Figura 8.6. Curvas de TGA y DTG de los sólidos de los procesos organosolv y procesos secuenciales: a) Organosolv autocatalítico y b) Organosolv ácido.	268
Figura 8.7. Parámetros de degradación térmica frente al contenido en LI (%) de sólidos tratados: a) $T_{10\%}$ y b) Cenizas a 800°C (%).	269

Figura 8.8. Espectros de FTIR de los sólidos de los procesos organosolv y procesos secuenciales: a) Organosolv autocatalítico y b) Organosolv ácido.....	271
Figura 8.9. Lignina precipitada en los procesos organosolv y procesos secuenciales. .	278
Figura 8.10. Pesos moleculares promedios de la lignina precipitada en los procesos organosolv y procesos secuenciales frente al factor de severidad (S_0) de la autohidrólisis.	280
Figura 8.11. Curvas TGA y DTG de la lignina precipitada en los procesos organosolv y procesos secuenciales: a) Organosolv autocatalítico y b) Organosolv ácido.	283
Figura 9.1. Curva de calibrado para el estándar de BSA.	290
Figura 9.2. Curvas de hidrólisis enzimática de los sólidos de los procesos organosolv y procesos secuenciales: a) Organosolv autocatalítico y b) Organosolv ácido.	291
Figura 9.3. Rendimiento de hidrólisis enzimática (%) frente al porcentaje en lignina Klason en los sólidos tratados (%).	293
Figura 9.4. Esquema del fraccionamiento de madera de pino con la secuencia AH ₁₅₀ -ORG _{A,185}	300

1. ABSTRACT/RESUMEN

1. ABSTRACT/RESUMEN

ABSTRACT

Title: Autohydrolysis and organosolv delignification of *Pinus radiata* wood for hemicellulose and lignin recovery with cellulosic fraction conversion by enzymatic route.

Introduction and objective

The depletion of fossil fuel reserves, growing concern about climate change and increasing greenhouse gas emissions are leading to consider new sources of energy and chemicals. One of the most promising alternatives is the biomass and biomass derived materials, framing their use within the biorefinery concept.

According to the definition of International Energy Agency (IEA), biorefining is the sustainable processing of biomass into bio-based products (food, feed, chemicals,

and materials) and bioenergy (biofuels, power and/or heat). The features necessary to define a biorefinery are: platforms, feedstock, products, and processes.

Lignocellulosic biomass is the most abundant and available renewable feedstock. The use of these materials has the advantage that they do not competition with food production. However, the major disadvantage is the recalcitrance structure to be transformed into added value products. To overcome this drawback, different pretreatments have been studied in order to get the fractionation of lignocellulosic materials into their major constituents, like cellulose, hemicellulose, and lignin. Thus, they can be used as biofuels precursors and others chemicals.

The different pretreatments can be classified according to their nature in physical, chemical, physical-chemical and biological pretreatment. They present different effect on the composition of lignocellulosic materials. The combined pretreatments, or two-step pretreatments, are currently considered to maximize the hemicellulose, and lignin recovery, and improve the enzymatic hydrolysis step.

The cellulose of pretreated solid is converted into its monomeric constituent, glucose, by the enzymatic hydrolysis. This step is carried out with the addition of cellulase enzyme complex. The hydrolysis yield depends on different factors such as cellulose accessibility and substrate composition. The pretreatment can alter these factors and enhances the cellulose digestibility.

The objective of this work is to study *Pinus radiata* fractionation by an autohydrolysis-organosolv pretreatment to maximize the hemicellulose extraction and lignin recovery, and to evaluate the conversion of cellulosic pretreated solid to glucose through a final enzymatic hydrolysis step. The autohydrolysis pretreatment of lignocellulosic biomass is of interest because enables the hemicelluloses extraction without the catalyst addition. For this reason, this process results environmental and economic attractive. The organosolv pretreatment promotes the separation and recovery of a high purity lignin that can be used in many applications. The treated solid is a good substrate to get high enzymatic hydrolysis yield. The novelty of this research is the use of this sequence of treatments on a conifer wood, which presents a

greater difficulty of delignification than other raw materials due to its lignin structure, such as *Pinus radiata*.

Results and conclusions

First, the concept of biorefinery, its classification and its platforms and final products are described. Then, the lignocellulosic material used as raw material, wood, is detailed. Subsequently, the different pretreatments are classified, focusing on autohydrolysis and organosolv process. In addition, the main objective of this thesis, sequential pretreatments are explained. Finally, the enzymatic hydrolysis and its main factors are described.

Second, the experimental procedure carried out during the research is developed. The experimental approach is showed, followed by the description of the methodology of the experimental design and the statistical analysis employed. Then, the *Pinus radiata* wood fractionation is detailed, including the materials and reagents, the reaction equipment used and the treatments of pine wood carried out. Finally, techniques of analysis selected for the characterization of the different phases obtained are described.

The results of the research are divided in three main parts according to the pretreatment carried out. First, the influence of autohydrolysis temperature and time on the hemicellulose extraction of pine was studied. For this purpose, the composition of solid and liquid phase obtained was analyzed. The operating conditions selected for this pretreatment are 170 °C of temperature, and 60 min of time in order to obtain a hemicellulose rich liquid phase with minimum degradation products. Under these conditions, a 60 % of hemicelluloses are extracted mainly in oligomeric form.

Second, the effect of ethanol concentration, temperature and time on the organosolv delignification of pine was studied. The characterization of solid and liquid phase, and organosolv lignin was carried out to determine the favourable operating conditions. According to the results, the experimental conditions selected are 200 °C, 100 min, and ethanol concentration of 50 wt% in order to get a cellulose rich solid (69,6 %), good delignification (70 %), and high lignin recovery (32,2 %).

Third, the sequential autohydrolysis and organosolv pretreatment was performed in order to evaluate the effect of hemicellulose extraction on the organosolv delignification. Moreover, the addition of acid catalyst in organosolv step was studied. Finally, the pretreated solid obtained was used as substrate for the saccharification of the cellulose in the enzymatic hydrolysis step. The sequential pretreatment with the high enzymatic hydrolysis, and good hemicelluloses, and lignin recovery was selected. The conditions of sequential pretreatment suitable are autohydrolysis (150 °C, and 30 min) and organosolv delignification (185 °C, 75 min, 50 wt% ethanol concentration, and 1 % of H₂SO₄) to obtain a cellulose rich solid (88 %) with good conversion yield (63 %) in addition to partial hemicellulose extraction of *Pinus radiata* wood (20 %).

RESUMEN

Título: Autohidrólisis y deslignificación organosolv de madera de *Pinus radiata* para la recuperación de hemicelulosas y lignina con aprovechamiento de la fracción celulósica por vía enzimática.

Introducción y objetivo

La disminución de las reservas de combustibles fósiles, la creciente inquietud por el cambio climático y el incremento de las emisiones de gases de efecto invernadero están llevando a considerar nuevas fuentes de energía y productos químicos. Una de las alternativas más prometedoras es la biomasa y sus materiales derivados, enmarcándose su aprovechamiento dentro del concepto de biorrefinería.

La biorrefinería consiste en el procesado sostenible de la biomasa para trasformarla en bioproductos (alimentos, piensos, materiales y productos químicos) y bioenergía (biocombustibles, electricidad y calor) según la definición de la Agencia

Internacional de la Energía. Los diferentes tipos de biorrefinería se clasifican según sus aspectos característicos: las plataformas o productos intermedios, los productos finales, las materias primas y los procesos de conversión.

La biomasa renovable más abundante y disponible a nivel mundial es la lignocelulósica, presentando como principal ventaja la no competencia con el suministro de alimentos. Sin embargo, una de sus desventajas es su naturaleza recalcitrante para ser convertida a productos de valor añadido. Para superar este inconveniente, en los últimos años se han estudiado diferentes pretratamientos para conseguir el fraccionamiento de los materiales lignocelulósicos en celulosa, hemicelulosa y lignina, y que puedan ser utilizados como precursores en biocombustibles y otros productos químicos.

Existen diferentes tipos de tratamientos, que se clasifican según su naturaleza en físicos, químicos, físico-químicos y biológicos. Para aprovechar los beneficios que ofrecen los pretratamientos de manera individual y minimizar sus inconvenientes, se están planteando actualmente los pretratamientos combinados o secuenciales. En ellos, los materiales lignocelulósicos se someten a dos etapas de tratamiento previas a su hidrólisis enzimática.

Durante esta etapa final, la celulosa presente en los sólidos tratados se despolimeriza en su monómero constituyente, glucosa, mediante la adición de celulasas. El rendimiento de la hidrólisis está condicionado por factores como la composición química del sustrato o la accesibilidad de las enzimas a la celulosa. Estos factores pueden modificarse mediante tratamientos previos de la biomasa para conseguir un sustrato receptivo a la acción enzimática.

El objetivo de esta tesis es el estudio del fraccionamiento de una madera de conífera, *Pinus radiata*, mediante un tratamiento secuencial autohidrólisis-organosolv para recuperar de forma selectiva hemicelulosas y lignina, y evaluar la conversión de la celulosa del sólido resultante a glucosa mediante una etapa de hidrólisis enzimática. El interés de la autohidrólisis es que permite la extracción selectiva de las hemicelulosas, a través de un proceso que se realiza sin la adición de catalizador, resultando muy atractivo desde el punto de vista medioambiental y económico. Por otro lado, el

tratamiento organosolv favorece la separación y la recuperación de una lignina de alta pureza, siendo adecuado para el tratamiento de materiales lignocelulósicos con un alto contenido en lignina, como la madera empleada en esta investigación. Finalmente, el sólido tratado obtenido resultará ser un buen sustrato para la etapa de hidrólisis enzimática. La novedad de la tesis radica en el empleo de esta secuencia de tratamientos sobre una madera de conífera, como es el *Pinus radiata*, la cual presenta una mayor dificultad de deslignificación que otras especies madereras debido a la estructura de su lignina. Además, se realiza un exhaustivo análisis y caracterización de las fracciones obtenidas.

Resultados y conclusiones

En la primera parte de la memoria se introduce el concepto de biorrefinería, su clasificación y los productos que se pueden obtener de ella. A continuación, se describe el material lignocelulósico empleado como materia prima en este trabajo, la madera, y se clasifican los diferentes pretratamientos existentes, prestando especial atención a los estudiados en esta tesis, la autohidrólisis y el proceso organosolv. También, se profundiza en los pretratamientos secuenciales, objetivo principal de esta investigación. Finalmente, se describe la hidrólisis enzimática y los factores involucrados en ella.

En la segunda parte del trabajo se explica el procedimiento experimental seguido en la investigación. En primer lugar, se recoge el planteamiento experimental realizado, explicando los distintos tratamientos de madera que se estudian. A continuación, se describe la metodología del diseño de experimentos y el análisis estadístico empleado. Posteriormente, se detalla el fraccionamiento de la madera, incluyendo los materiales y reactivos usados, el equipo de reacción utilizado y la descripción de los tratamientos llevados a cabo sobre la madera de pino. Finalmente, se describen las técnicas de análisis seleccionadas para la caracterización de las fases obtenidas en los experimentos.

Los resultados de la investigación se estructuran en tres bloques, en función del tratamiento aplicado. En el primero, se estudia el efecto de la temperatura y el tiempo de la autohidrólisis sobre la extracción de hemicelulosas de la madera de pino. Se

seleccionan como las mejores condiciones la temperatura de 170 °C y el tiempo de 60 min, bajo las que se extrae un 60 % de las hemicelulosas principalmente en forma de oligosacáridos.

En el segundo bloque, se evalúa la influencia de la concentración de etanol, el tiempo y la temperatura en la deslignificación de la madera mediante el proceso organosolv. Se seleccionan como condiciones de operación más favorables: 50 % de etanol, 200 °C y 100 min, consiguiendo un sólido rico en celulosa (69,6 %), una alta deslignificación (70 %) y una buena recuperación de lignina (32,2 %).

En el tercer bloque, se completa el trabajo con el estudio de la combinación de los tratamientos previamente evaluados planteando un proceso secuencial y utilizando el sólido final obtenido como sustrato en la etapa de hidrólisis enzimática. Además, se estudia la incorporación de un catalizador ácido al proceso organosolv. La secuencia que ofrece mejores resultados es la formada por una autohidrólisis bajo condiciones moderadas (150 °C y 30 min) y un proceso organosolv catalizado por un ácido (185 °C, 75 min, 50 % etanol y 1 % de H₂SO₄). Bajo estas condiciones, se recupera un 20 % de las hemicelulosas de la madera y se obtiene un sólido rico en celulosa (88 %) con buena conversión de hidrólisis (63 %).

2. LA BIORREFINERÍA

2. LA BIORREFINERÍA

La disminución de las reservas de combustibles fósiles, la creciente inquietud por el cambio climático y el incremento de las emisiones de gases de efecto invernadero están llevando a la consideración de nuevas fuentes de energía y productos químicos. Para el año 2020, la Unión Europea se ha planteado los siguientes objetivos en materia de cambio climático y energía: reducir un 20 % las emisiones de gases efecto invernadero, incrementar hasta un 20 % la contribución de la energía procedente de fuentes renovables y mejorar un 20 % la eficiencia energética (PER, 2011). Además, dentro de la Directiva 2009/28/CE, se ha fijado que el 10 % de la energía usada en el sector transporte proceda de fuentes renovables. A largo plazo, para el año 2050, el Consejo Europeo tiene como objetivo la descarbonización de la economía, a fin de conseguir la reducción de las emisiones de CO₂ de un 80 a un 95 % (Scarlat y col., 2015; Zhang y col., 2016a; Zhang y col., 2016b).

Ante este escenario, la biomasa y los materiales derivados de ella son una de las alternativas más prometedoras para disminuir la actual dependencia de las fuentes de energía fósiles. Estos materiales se consideran la única fuente sostenible de carbono orgánico en la tierra, ya que se generan mediante la fotosíntesis a partir del CO₂ atmosférico, agua y luz solar (Isikgor y Becer, 2015). El aprovechamiento de la biomasa se enmarca dentro del concepto de biorrefinería.

Según la definición de la Agencia Internacional de la Energía (IEA), la biorrefinería consiste en el procesado sostenible de la biomasa para trasformarla en bioproductos (alimentos, piensos, materiales y productos químicos) y bioenergía (biocombustibles, electricidad y calor) (Jungmeier y col., 2015). Comparando el concepto de biorrefinería de forma análoga al de las refinerías de petróleo, que produce múltiples combustibles y productos a partir del petróleo, el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL) la define como una instalación que integra los procesos y los equipos necesarios para la conversión de biomasa y producir combustibles, electricidad y productos químicos a partir de biomasa (Figura 2.1).

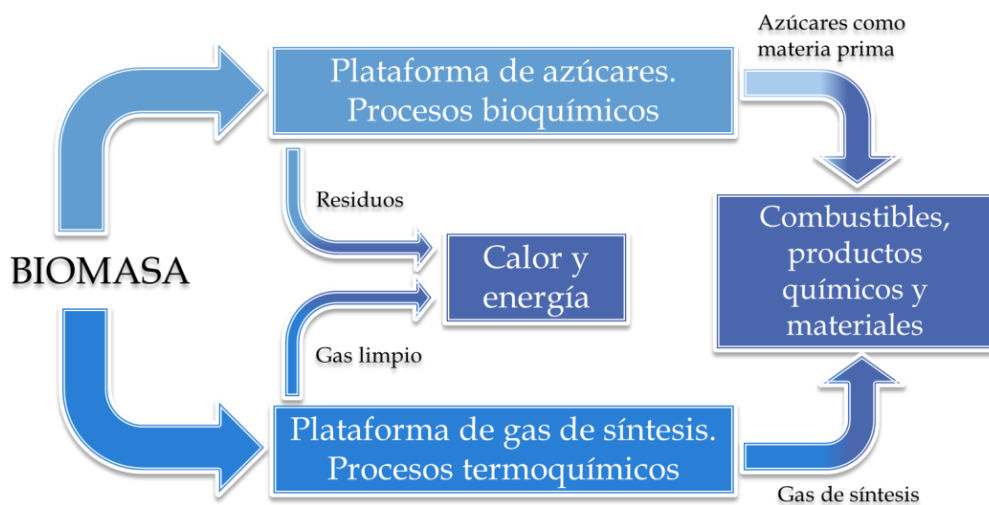


Figura 2.1. Esquema de biorrefinería por NREL.

2.1. Clasificación de las biorrefinerías

Dentro del concepto de biorrefinería, existen distintos tipos que se pueden clasificar en base a criterios tales como el grado de implementación tecnológica, el tipo de materias primas usadas, los productos intermedios producidos o los principales procesos de transformación utilizados. A continuación, se citan algunos ejemplos existentes dentro de los diferentes criterios (Kamm y Kamm, 2004; Cherubini y col., 2009; García, 2009):

➤ Según el grado de implementación tecnológica:

- Biorrefinería de primera generación → Presentan poca flexibilidad en la capacidad de procesado, principalmente producen biocombustibles y algún coproducto. Por ejemplo, la producción de etanol a partir de cereales.
- Biorrefinería de segunda generación → Presentan mayor flexibilidad en la capacidad de procesado y obtención de bioproductos, como es la obtención de etanol empleando el procesado del grano de cereal por molienda húmeda.
- Biorrefinería de tercera generación → Son las más flexibles en cuanto al uso de diferentes materias primas, procesos de conversión y productos finales; hacen más sostenible el uso de la biomasa. Es el caso de las biorrefinerías con aprovechamiento integral de cultivos (cereales) o las basadas en materiales lignocelulósicos.

➤ Según el tipo de materias primas utilizadas:

- Biorrefinería de materiales lignocelulósicos → Aprovechan este tipo de materiales, fraccionándolos en sus compuestos principales (lignina, celulosa y hemicelulosa).
- Biorrefinería de cultivo completo → Usan los cultivos de cereales como centeno, trigo y maíz de forma completa, incluyendo la paja.
- Biorrefinería verde → Su materia prima es biomasa húmeda, como hierbas, alfalfa, trébol o cereales inmaduros.
- Biorrefinería marina → Usan como materia de partida biomasa acuática, tanto microalgas como macroalgas.

➤ Según los principales procesos de transformación utilizados:

- Biorrefinería termoquímica → La conversión de los productos se realiza mediante un proceso termoquímico, como combustión, gasificación o pirólisis.
- Biorrefinería bioquímica → La transformación de las materias primas se lleva a cabo siguiendo una ruta bioquímica, como puede ser la digestión anaerobia o la fermentación.
- Biorrefinería de plataforma doble → Utilizan todo tipo de biomasa, incluyendo procesos de conversión tanto bioquímica como termoquímica.

➤ Según los productos intermedios producidos, se pueden destacar:

- Biorrefinería de plataforma de gas de síntesis → Mediante la gasificación de la biomasa se produce una corriente compuesta principalmente por hidrógeno y monóxido de carbono (gas de síntesis) que permite aprovechar todos los componentes de la misma.
- Biorrefinería de plataforma de lignina → La lignina puede usarse como fuente de energía o como materia prima para obtener otros compuestos.
- Biorrefinería de plataforma de azúcares → A partir de los azúcares de la biomasa se pueden obtener polímeros o aplicar transformaciones químicas para producir otros compuestos.

Con el objetivo de intentar aunar criterios, en el año 2008 la Agencia Internacional de la Energía (dentro de su tarea nº 42) desarrolló un nuevo sistema de clasificación de biorrefinerías. Éste consiste en la representación esquemática de la cadena de transformación de la biomasa, desde la materia prima hasta sus productos finales. A fin de que se puedan identificar y describir todos los tipos de biorrefinería, se incluyen los cuatro principales aspectos que las caracterizan (Cherubini y col., 2009; de Jong y Jungmeier, 2015):

1. Los **productos intermedios generados**, también denominados “plataformas”, como son los azúcares de 5 y 6 carbonos, el gas de síntesis, el biogás, la lignina, los aceites, los líquidos de pirólisis o el calor y la electricidad. Aunque, en ocasiones, estos productos también pueden ser considerados como finales.

El número de plataformas que se generen en el sistema es un indicativo de la complejidad del mismo.

2. Los **productos finales obtenidos**, que pueden dividirse en dos grandes grupos: productos y energía. Entre los productos, se contemplan los productos químicos, los materiales, los alimentos y los piensos. En cuanto a la energía, se engloban los biocombustibles sintéticos, el bioetanol y el biodiésel.
3. Las **materias primas usadas**, se pueden clasificar en función de su procedencia en: cultivos energéticos o residuos. En el primer grupo se incluyen los cultivos lignocelulósicos, las hierbas y los pastos, los cultivos acuáticos, los oleaginosos y los alcoholígenos. En cuanto a los residuos de biomasa pueden ser de origen agrícola, forestal, industrial o urbano.

Otra clasificación de la biomasa establece que puede dividirse en: primaria, secundaria y terciaria. La primaria es aquella que procede de la cosecha forestal o agraria; la secundaria engloba los residuos procedentes de la industria forestal como son los residuos de aserraderos o la lejía negra de la obtención de pastas de papel y la terciaria abarca los residuos procedentes del consumo humano como las aguas residuales o los residuos sólidos municipales.

4. Los **procesos de conversión utilizados** para transformar las materias primas en productos se clasifican en cuatro grandes grupos: mecánicos/físicos, bioquímicos, químicos y termoquímicos.

En la Figura 2.2 se esquematiza un proceso genérico donde se recogen las cuatro propiedades utilizadas para describir las biorrefinerías, siguiendo la clasificación marcada por la Agencia Internacional de la Energía (IEA).

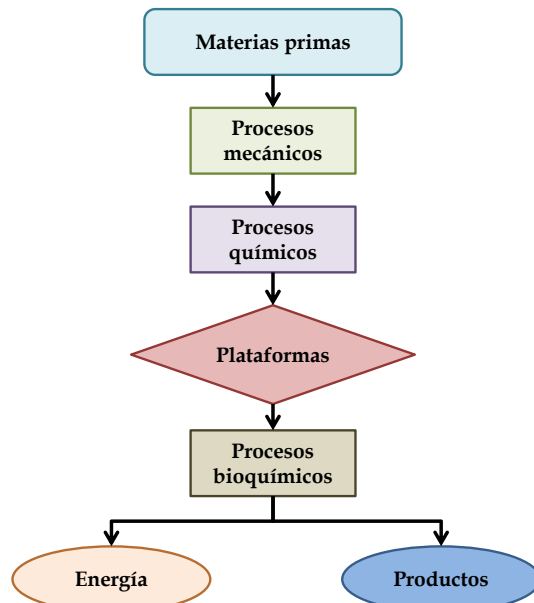


Figura 2.2. Esquema genérico de biorrefinería (Cherubini y col., 2009).

Con esta nueva clasificación, el tipo de biorrefinería quedaría descrito al detallar las plataformas, los productos finales, la materia prima y los procesos implicados. A modo de ejemplo, en la Figura 2.3 se representa una biorrefinería de tres plataformas (lignina, azúcares de 5 y 6 carbonos, y calor y electricidad) que usa astillas de madera como materia prima para producir tres productos finales (fenoles, calor y electricidad y bioetanol).

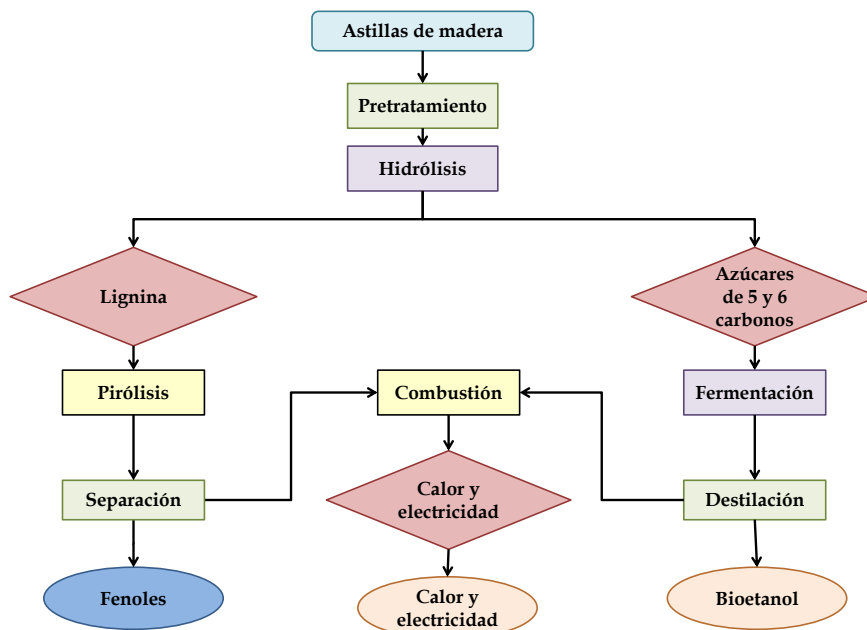


Figura 2.3. Esquema de biorrefinería con tres plataformas y tres productos usando madera como materia prima (de Jong y Jungmeier, 2015).

En este esquema se muestra el fraccionamiento de astillas de madera mediante un pretratamiento y una hidrólisis enzimática. Tras separar sus componentes principales, lignina y carbohidratos (azúcares de 5 y 6 carbonos), éstos se pueden transformar en productos finales por diferentes rutas y procesos de conversión. A partir de la lignina se pueden recuperar fenoles tras una etapa de purificación de los aceites de pirólisis o producir bioetanol tras la fermentación y destilación de los azúcares liberados tras la hidrólisis. También se contempla la posibilidad de obtener calor y electricidad mediante la combustión de los residuos de los otros dos procesos involucrados.

2.2. Biorrefinerías de materiales lignocelulósicos

La biomasa renovable más abundante y disponible a nivel mundial es la biomasa lignocelulósica. Se considera una alternativa prometedora al crudo de petróleo, ya que a partir de ella se pueden producir combustibles y productos químicos. Además, presenta ciertas ventajas frente a otro tipo de biomasa como son: la no competencia con el suministro de alimentos (hecho que ocurre con los cultivos alcoholígenos de azúcar y almidón); puede proceder de residuos forestales, agrícolas y agroalimentarias, conllevando así la transformación de un residuo a productos de valor añadido y es más barata que otro tipo de materias primas agrícolas. Sin embargo, una de sus desventajas principales es que la conversión a los productos de valor añadido, como compuestos de química fina o polímeros, es todavía una tarea pendiente (Isikgor y Becer, 2015). A continuación, se describen algunas de las plataformas y los productos finales que se pueden encontrar dentro de una biorrefinería cuyo material de partida sea un material lignocelulósico.

2.2.1. Plataformas procedentes de materiales lignocelulósicos

La ruta de transformación desde la biomasa a los productos finales comienza con la liberación de los azúcares presentes en ella. La biomasa lignocelulósica está principalmente constituida por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, de los cuales, los dos primeros se componen por azúcares de 5 y 6 carbonos. A partir de la despolimerización de la celulosa se obtiene glucosa, mientras que la hidrólisis de las hemicelulosas genera pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (glucosa, galactosa y

manosa). La ruta de transformación se puede dividir en dos etapas: una primera que consiste en la conversión de los azúcares a “*building blocks*” y una segunda basada en la síntesis de productos químicos secundarios o familias de derivados a partir de ellos. Estos “*building blocks*” son moléculas con diferentes grupos funcionales que pueden ser transformados en nuevas familias de moléculas (Werpy y col., 2004).

Isikgor y Becer (2015) recopilaron más de 200 compuestos químicos derivados de los azúcares y la lignina procedentes de biomasa lignocelulósica, que se obtenían usando transformaciones tanto químicas como biológicas. En este trabajo tomaban como referencia plataformas estudiadas y seleccionadas en estudios previos (Werpy y col., 2004; Bozell y Petersen, 2010). La selección de estas plataformas tenía en cuenta criterios como el interés de la bibliografía por ellas, su aplicación en la obtención de diferentes productos, la posibilidad de escalado industrial y grandes volúmenes de trabajo o su potencial para ser sustitutos directos de productos petroquímicos. Algunas de ellas se muestran en la Figura 2.4.

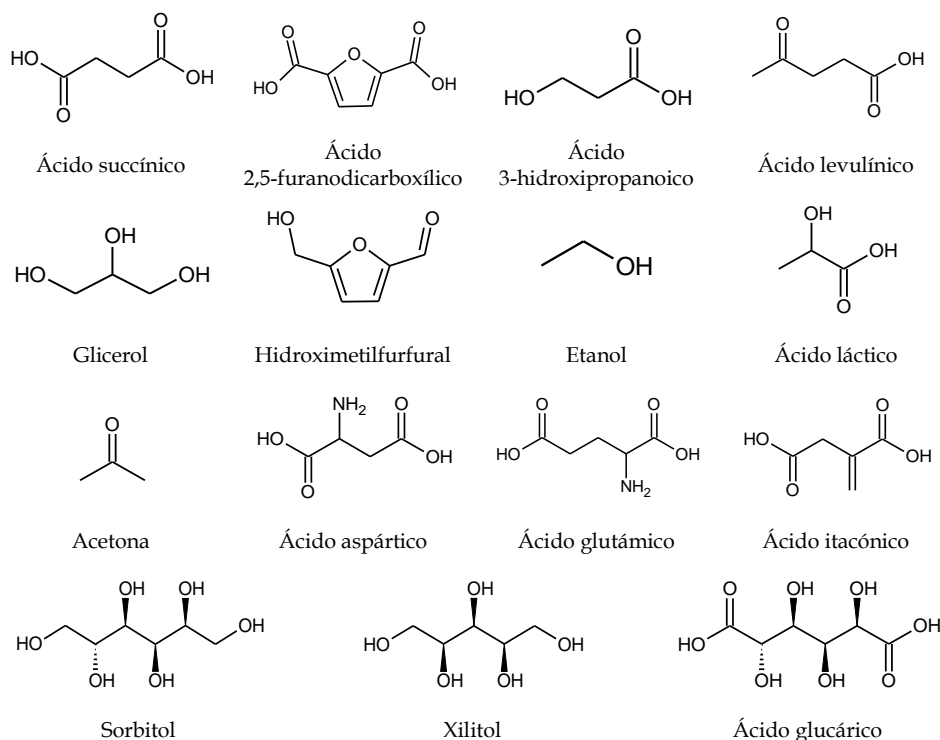


Figura 2.4. Plataformas químicas procedentes de materiales lignocelulósicos (Isikgor y Becer, 2015).

A partir de estas plataformas, se pueden conseguir multitud de productos químicos y materiales. A continuación, se detallan algunos ejemplos (Isikgor y Becer, 2015; Putro y col., 2016):

- El ácido 2,5-furanodicarboxílico puede sustituir al ácido tereftálico en la producción de PET para la producción de botellas de plástico.
- El ácido levulínico tiene aplicación como aditivo en combustibles, polímeros y resinas.
- El sorbitol y xilitol provienen de la hidrogenación de hexosas y pentosas usando un catalizador; tienen aplicación en la industria alimentaria como edulcorantes.
- El glicerol es ampliamente usado en la industria para fabricar biosolventes, cosméticos, baterías, polímeros y surfactantes. En la reacción de formación de glicerol, también se obtienen otros productos como etilenglicol y polietilenglicol.
- El ácido succínico y el ácido láctico son generados a partir de los carbohidratos mediante conversión biológica. La aplicación industrial del ácido succínico es de especial interés para la fabricación de surfactantes, agentes espumantes, agentes antimicrobianos, etc., mientras que el ácido láctico tiene su principal aplicación en la producción de polímeros biodegradables, así como en la industria alimentaria.
- El hidroximetilfurfural (HMF) es un producto químico intermedio muy versátil, ya que a partir de él se pueden obtener diferentes derivados furánicos como es el 2,5-dimetilfurano, un posible sustituto de la gasolina.

En cuanto a los compuestos procedentes de la lignina, los más interesantes son los compuestos fenólicos. Para llegar a ellos, se requiere la despolimerización previa de la lignina, existiendo diferentes métodos de transformación como la licuefacción, la oxidación o el hidrocrqueo. Tras la rotura de los oligómeros que la componen, se obtienen moléculas como fenoles, aldehídos, aromáticos o cetonas, que presentan muchas aplicaciones industriales. Entre todos ellos, la vainillina es el compuesto fenólico con más posibilidades para reemplazar a materiales procedentes del petróleo. Sin embargo, presenta grandes inconvenientes como son su separación y su purificación (Isikgor y Becer, 2015; Putro y col., 2016).

La lignina procedente de la industria de la pasta y del papel supone entre 50 y 55 millones de toneladas por cada 130 de pasta producida anualmente (Bruijninx y

col., 2015; Mahmood y col., 2016). A esta cantidad, actualmente, habría que sumar la lignina generada en la producción del etanol lignocelulósico. Esta industria ha tenido un gran crecimiento en los últimos años; en uno de los principales productores de etanol, Estados Unidos, se espera que la producción en el año 2016 sea de 780 millones de litros, según datos de la EPA (*Environmental Protection Agency*). La generación de esta lignina varía entre 0,5 y 1,5 kg por cada litro de etanol producido en función de la materia prima usada. Por tanto, una valorización eficiente de este polímero resulta clave para la viabilidad económica de las biorrefinerías (Bruijninx y col., 2015).

2.2.2. Productos procedentes de materiales lignocelulósicos

Los productos finales procedentes de la biomasa se dividen en dos grandes grupos: bioproductos (alimentos, piensos y materiales) y bioenergía. En la Figura 2.5 se muestra la distribución de la biomasa en función de su producto final. Según datos de la Unión Europea, en el año 2011 y partiendo de un volumen total de 2 millones de toneladas, la mayor parte de la biomasa se destinó a la fabricación de alimentos y piensos de animales (65 %), siendo el menor porcentaje el que se utilizó para la producción de energía (12 %) (Scarlat y col., 2015).

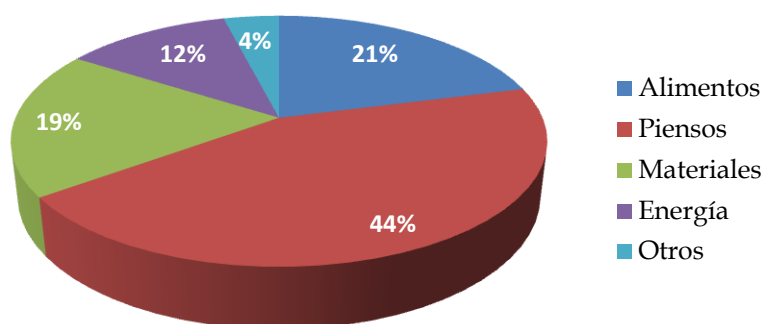


Figura 2.5. Distribución de la biomasa según aplicación (Scarlat y col., 2015).

A continuación, se describen diferentes ejemplos de los productos derivados de la biomasa lignocelulósica, divididos en bioproductos y bioenergía.

2.2.2.1. Bioproductos de materiales lignocelulósicos

Los bioproductos procedentes de los materiales lignocelulósicos se pueden dividir en dos categorías: aquellos que son obtenidos por el uso directo de los polímeros que conforman estos materiales, y aquellos que deben ser sometidos a etapas intermedias de hidrólisis para formar los “*building blocks*” y a transformaciones químicas, térmicas y biológicas para llegar a los productos finales (Zamani, 2015).

En la primera categoría, los productos derivados del uso directo de la celulosa destacan: el papel y la pasta, las fibras y los tejidos, la nanocelulosa y los derivados de celulosa. Con respecto a los procedentes del uso directo de la hemicelulosa, se encuentran los films de envasado y los revestimientos para productos alimenticios; también se están desarrollando nuevas aplicaciones en la producción de hidrogeles combinados con otros biopolímeros.

En la segunda categoría se encuentran los bioproductos obtenidos a partir de la hidrólisis de estos polímeros (celulosa y hemicelulosa). La hemicelulosa es más susceptible a la hidrólisis y libera sus azúcares más fácilmente que la celulosa. Sin embargo, para que la producción de glucosa desde la celulosa sea eficiente, se requiere un pretratamiento del material lignocelulósico de partida. Métodos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos han sido aplicados para mejorar esta sacarificación mediante la eliminación de la lignina y la hemicelulosa.

Entre los diferentes productos procedentes de los materiales lignocelulósicos, cabe destacar los bioplásticos. El ácido poliláctico, un plástico biodegradable producido por la polimerización del ácido láctico, es uno de los ejemplos más representativos de estos materiales. Los plásticos procedentes de biomasa tienen múltiples aplicaciones en embalajes, electrodomésticos o automóviles. A pesar de que en la actualidad, la mayoría de estos bioplásticos proceden de cultivos alimentarios como el maíz, se espera que a largo plazo sean producidos a partir de materiales lignocelulósicos. Se estima que la capacidad de producción global de los bioplásticos se incremente desde los 1,7 millones de toneladas del año 2014 hasta los 7,8 millones de toneladas en 2019 (Scarlat y col., 2015; European Bioplastic, 2016).

2.2.2.2. Bioenergía de materiales lignocelulósicos

La bioenergía (energía procedente de la biomasa) se espera que represente el 57 % de la energía renovable en la Unión Europea para el año 2020; siendo un 45 % en forma de calor y electricidad y un 12 % en forma de biocombustibles (Scarlat y col., 2015). Se estima que 420 millones de toneladas serán usadas para la obtención de este tipo de energía a diferencia de los 280 millones utilizados en el año 2012. En cuanto al valor económico de la bioenergía, en el año 2012 supuso 34 billones de euros, mientras que se calcula que represente 44 billones de euros en el año 2020 según las predicciones de NREAPs (*National Renewable Energy Action Plans*).

A día de hoy, la mayoría de los biocombustibles se producen a partir de cultivos alimentarios, es decir, de biomasa primaria. Sin embargo, el Consejo Europeo ha limitado a un 7 % el uso de los combustibles convencionales en el transporte para el año 2020; dentro del 3 % restante hasta alcanzar el 10 % fijado para la energía procedente de renovables se encuentran los materiales lignocelulósicos como material de partida. Esto supone que 15 millones de toneladas de esta biomasa lignocelulósica serán convertidas a biocombustibles de segunda generación (DIRECTIVA (UE) 2015/1513; Scarlat y col., 2015). El gas de síntesis, biogás, bioaceite (aceite de pirólisis), biohidrógeno o bioetanol son algunos de los biocombustibles que pueden producirse (Putro y col., 2016).

El etanol lignocelulósico es una de las alternativas más prometedoras a los combustibles fósiles debido a su limpia combustión; presenta un 34 % menos de emisiones de CO₂ frente a la combustión de gasolinas, y a sus propiedades físicas; mayores índice de octano y calor de vaporización que la gasolina. Se emplea directamente en motores especializados o mezclándolos con gasolinas en diferentes proporciones, dando lugar a las conocidas mezclas E10, E15, E30 y E85 (Ioelovich, 2015; Sun y col., 2016).

La producción del etanol celulósico puede llevarse a cabo mediante ruta termoquímica o ruta biológica, siendo esta última la más común. En la Figura 2.6 se muestra el proceso para la obtención del etanol celulósico a través de la ruta biológica, que consta de cuatro etapas principales (Ioelovich, 2015; Talebnia, 2015).

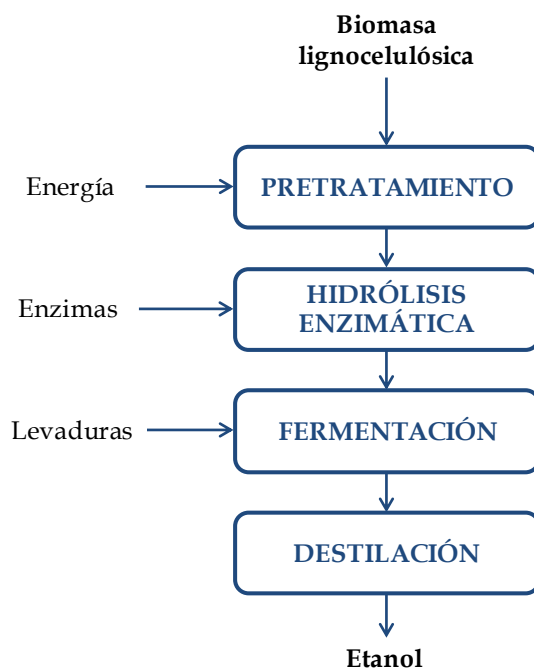


Figura 2.6. Esquema del proceso de obtención del etanol celulósico.

La primera etapa es el pretratamiento que tiene por objetivo romper la estructura recalcitrante de la biomasa lignocelulósica, a fin de mejorar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa, mediante el incremento del área superficial y la porosidad. La biomasa tratada se somete a una etapa de hidrólisis enzimática, en la cual se lleva a cabo la despolimerización de la celulosa para liberar su monómero constituyente (glucosa), mediante un complejo enzimático denominado celulasas. La siguiente etapa es la fermentación, donde se produce la conversión de glucosa a etanol mediante el uso de levaduras, siendo la más frecuente la *Saccharomyces cerevisiae*, ya que puede tolerar mayor concentración de etanol en el medio (20 %). Finalmente, se lleva a cabo la separación y purificación del etanol, donde se realiza la destilación del etanol hasta conseguir una concentración de 95-96 % (en peso) y la posterior deshidratación del etanol hasta alcanzar el 99 % de pureza.

Existen diferentes configuraciones para la transformación de los materiales lignocelulósicos a bioetanol, planteando las etapas de sacarificación y fermentación de forma independiente o llevándolas a cabo de forma conjunta (Figura 2.7). De esta forma, se desarrollan diferentes grados de integración (Tomás-Pejó, 2010; Sarkar y col., 2012):

- La hidrólisis y la fermentación separada (HFS) es la configuración más común. Las ventajas principales que presenta son que cada etapa se puede realizar bajo sus condiciones óptimas de temperatura y pH.
- La sacarificación y fermentación simultánea (SFS) donde ambas etapas se llevan a cabo en un mismo reactor. La glucosa liberada desde la celulosa se fermenta a etanol directamente, evitando así la inactivación de las celulasas y mejorando los rendimientos de hidrólisis.
- La sacarificación y co-fermentación simultánea (SCFS) consiste en la fermentación individual de la fase sólida y la fase líquida procedentes del pretratamiento. Se plantea para aquellas materias primas con alto contenido en xilosa, como por ejemplo, las maderas duras y los residuos agrícolas.
- El bioproceso consolidado (BPC) en el que se engloba, además de la hidrólisis del material pretratado y las fermentaciones de pentosas y hexosas, la producción de las enzimas. Para ello, se necesitan bacterias que produzcan la enzima que hidroliza la celulosa y fermenten la glucosa a etanol, como *Clostridium thermocellum*.

La detoxificación es una etapa que se realiza sobre la fase líquida resultante del pretratamiento a fin de eliminar productos de degradación como furanos, ácidos carboxílicos y compuestos fenólicos. De esta forma, se obtiene una corriente rica en pentosas con la mínima cantidad de inhibidores para ser empleada en una posterior etapa biológica de fermentación (Ojeda y col., 2011).

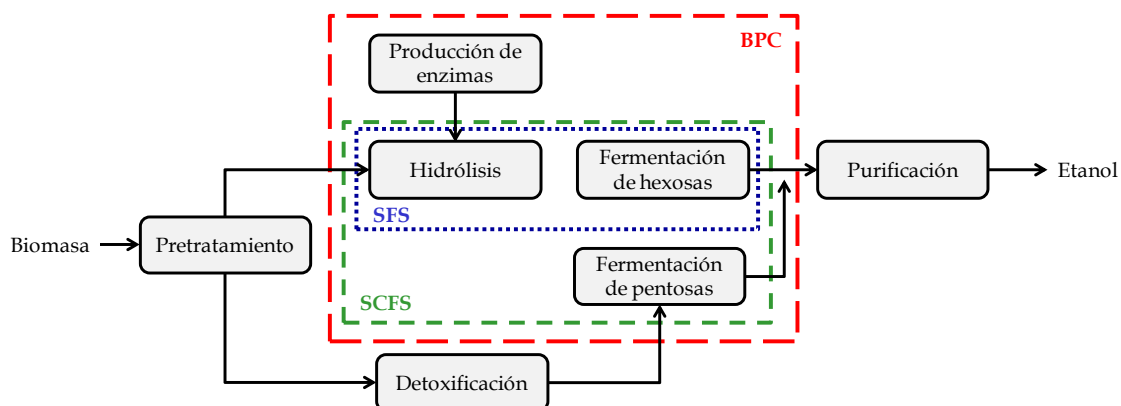


Figura 2.7. Configuraciones posibles para producción de bioetanol (Ojeda y col., 2011).

La tecnología de producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos está implantada por numerosas empresas en planta piloto y demostración (Bacovsky y col., 2013). Algunas de las situadas en Europa y Norteamérica se recogen en la Tabla 2.1, junto con las materias primas utilizadas, la capacidad de la planta y el tipo de escala.

Tabla 2.1. Plantas piloto y demostración de bioetanol lignocelulósico (datos de IEA).

Compañía	Localización	Materias primas	Capacidad (t/año)	Tipo
Abengoa	York (EEUU)	Paja de trigo	75	P
Abengoa	Babilafuente (España)	Cereales y paja de trigo	4.000	D
BetaRenewables	Rivalta scrivia (Italia)	Rastrojo de maíz, paja, cultivos energéticos	250	P
Borregaard	Sarpsborg (Noruega)	Bagazo de caña de azúcar, paja, madera	110	D
Dupont	Vonore (EEUU)	Lignocelulósico, residuos de maíz y hierbas	750	D
Inbicon	Kalundborg (Dinamarca)	Paja de trigo	4.300	D
Iogen	Ottawa (Canadá)	Trigo, avena, bagazo, rastrojo de maíz y paja de cebada	1.600	D
Lignol	Burnaby (Canadá)	Residuos de maderas duras y blandas	100	P
Mascoma	Rome (EEUU)	Astillas de madera, hierbas y rastrojo de maíz	500	D
Petrobras	Río de Janeiro (Brasil)	Bagazo de caña de azúcar	270	P
POET	Scotland (EEUU)	Residuos agrícolas	60	P
Sekab	Örnsköldsvik (Suecia)	Residuos madera blanda	160	P

P: escala planta piloto

D: escala demostración

Se comprueba la diversidad de materiales lignocelulósicos que pueden ser empleados como materia prima en la obtención de bioetanol como son residuos agrícolas y forestales, maderas, hierbas o cultivos energéticos. Cabe comentar que algunas de las empresas que poseen planta piloto, también presentan plantas comerciales para la producción de bioetanol como es el caso de BetaRenewables cuya planta tiene una capacidad de 60.000 t/año en Crescentino (Italia) o Borregaard con 15.800 t/año en su planta situada en Sarpsborg (Noruega) (BetaRenewables, 2016; EBTP, 2016).

2.3. La madera como material lignocelulósico

Como ya se ha comentado anteriormente, los materiales lignocelulósicos presentan una serie de ventajas frente a otro tipo de biomasa, como es su gran disponibilidad o la no competencia con productos alimentarios. Existen diferentes tipos de materiales lignocelulósicos como son residuos agrícolas, hierbas, maderas duras, maderas blandas, residuos celulósicos y co-productos industriales (Ruiz y col., 2013), considerándose a la madera como una de las más importantes.

La madera ha sido una fuente primaria de energía para la humanidad. A día de hoy, sigue siendo la fuente de energía renovable más utilizada, proporcionando el 9 % del suministro total de la energía primaria e igualando la suma del resto de energías renovables (hidro- y geotérmica, residuos, solar y biocombustibles líquidos) (FAO, 2016). Sin embargo, también se considera una de las materias primas más prometedoras. Además de su empleo en la industria de la pasta y el papel, y como material de construcción, se están desarrollando productos de valor añadido derivados de ella (Viell y col., 2013).

A continuación se profundiza en este material lignocelulósico. Se indican los tipos de madera, se detallan los principales componentes que la conforman y, finalmente, se comenta la materia prima de este trabajo, la madera de *Pinus radiata*.

2.3.1. Tipos de madera

Las maderas se clasifican en dos grandes grupos: las maderas duras o frondosas y las maderas blandas o coníferas. Las maderas duras son angiospermas y poseen hojas caducas. Se caracterizan por ser porosas, ya que contienen elementos conductores (vasos) por los que circula el agua o la savia del árbol. Algunos ejemplos de este tipo de madera son el eucalipto, el haya, el roble o el nogal. Las maderas blandas son gimnospermas y tienen hojas perennes. A diferencia de las duras, no poseen una estructura porosa. Algunas especies de este tipo son el pino, el abeto, el álamo o el abedul (Wiemann, 2010).

Las células de las maderas se pueden clasificar según su función en conductoras, de soporte o de almacenamiento. En el caso de las maderas duras, las células conductoras son vasos y las células de soporte son fibras. Para las maderas blandas, las células mayoritarias son las traqueidas (90-95 %) y en menor proporción las células radiales (5-10 %). Las traqueidas son células alargadas que cumplen la función de conductoras y de soporte mecánico (Sjöström, 1981).

En la Figura 2.8 se muestra la estructura de las células de la madera, compuestas principalmente por dos componentes: el lumen y la pared celular. El lumen (L) es un espacio hueco dentro de la célula, destinado a la conducción de agua. La pared celular tiene tres regiones: la lámina media (M), la pared primaria (P) y la pared secundaria. A su vez, la pared secundaria está constituida por tres subcapas (S1, S2 y S3) (Schwarze, 2007).

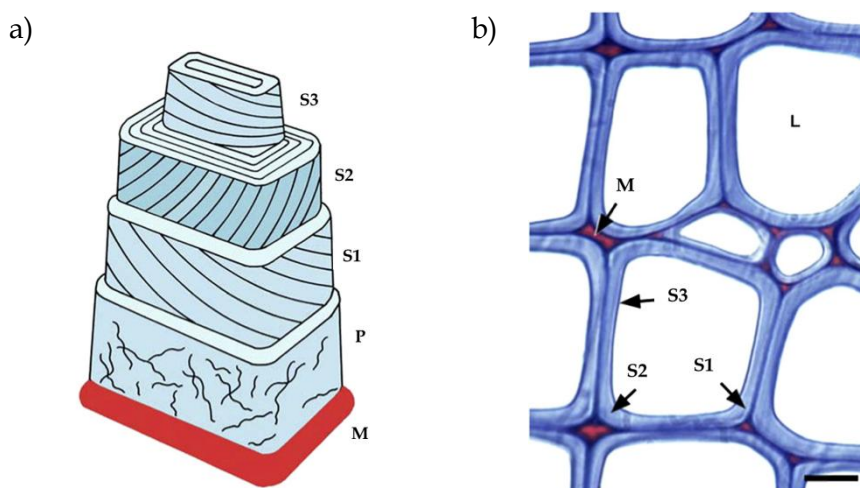


Figura 2.8. a) Modelo de pared celular y b) Sección transversal (Schwarze, 2007).

Las células se encuentran adheridas unas a otras y actúan como un todo, es decir, se encuentran interconectadas para permitir el movimiento de productos y agua. La lámina media (M) es la responsable de dicha adhesión y se encuentra lignificada. En la pared primaria predominan la celulosa, la hemicelulosa y las pectinas. En las células de madera, esta pared es tan delgada, que no se distingue de la lámina media, por lo que se consideran una única región (Wiedenhoef, 2010). De forma general, la celulosa proporciona la resistencia, la lignina es el material frágil y la hemicelulosa es el

polímero compuesto por las moléculas ramificadas que enlazan la celulosa y la lignina. La disposición de estos polímeros en la pared celular se muestra en la Figura 2.9.

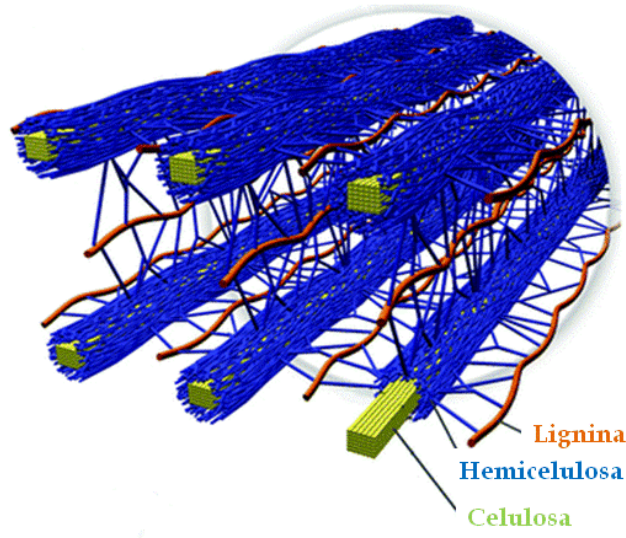


Figura 2.9. Disposición de celulosa, hemicelulosa y lignina en la pared celular de materiales lignocelulósicos (Doherty y col., 2011).

El transporte de agua entre células adyacentes se produce mediante las llamadas punteaduras. Se trata de poros presentes en la pared secundaria de las células que sirven de canales para conectar el lumen de células contiguas, como se muestra en la Figura 2.10.

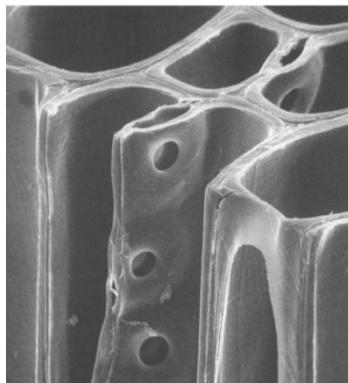


Figura 2.10. Punteaduras en maderas blandas (Keey, 2005).

En el caso de las maderas blandas, las punteaduras, también denominadas pares de punteaduras, son importantes para que se lleve a cabo el trasvase de agua en las traqueidas (Wiedenhoeft, 2010).

2.3.2. Composición de la madera

La madera, como otras biomásas vegetales, está constituida por polímeros orgánicos (Figura 2.11). Los mayores componentes estructurales son los carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) que suponen entre un 65-75 % del total y la lignina que representa entre un 18-35 %. En menor proporción (4-10 %), la madera presenta componentes de bajo peso molecular: los extractos orgánicos y las cenizas o minerales inorgánicos (Mohan y col., 2006).

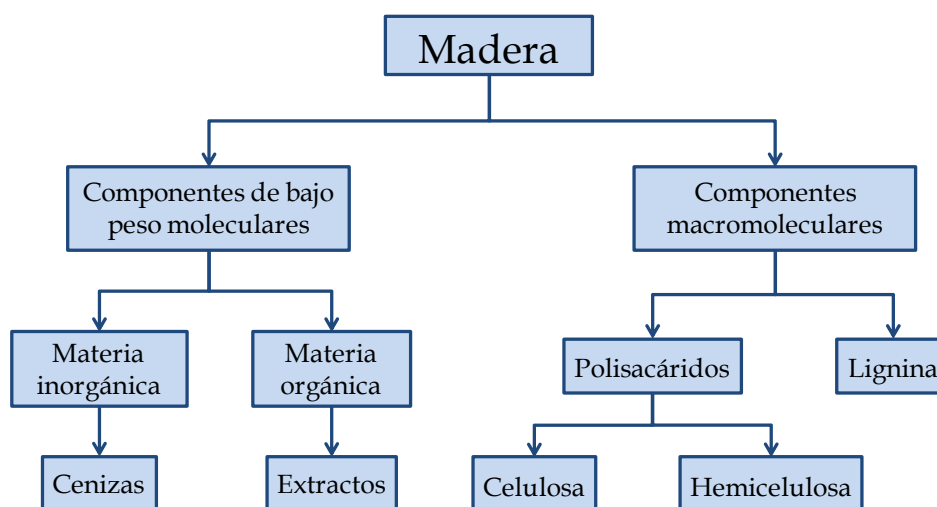


Figura 2.11. Componentes de la madera (Mohan y col., 2006).

La composición de la madera es muy variable, dependiendo de factores como el tipo de especie, la localización geográfica y las condiciones ambientales y del suelo. En la Tabla 2.2 se recogen los datos de composición química de algunas especies de los dos tipos de maderas.

Tabla 2.2. Composición de maderas duras y blandas (Windeisen y Wegener, 2009).

Tipo	Especie	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Extractos (%)
Maderas duras	<i>Betula verrucosa</i>	41,0	32,4	22,0	3,2
	<i>Eucalyptus globulus</i>	51,0	25,2	21,9	1,3
	<i>Fagus sylvatica</i>	39,4	33,3	24,8	1,2
Maderas blandas	<i>Abies balsamea</i>	38,8	28,5	29,1	2,7
	<i>Picea abies</i>	41,7	28,3	27,4	1,7
	<i>Pinus sylvestris</i>	40,0	28,5	27,7	3,5

A continuación se detallan los componentes de la madera: la celulosa, la hemicelulosa, la lignina y los extractos y cenizas, describiendo los principales constituyentes que los conforman.

2.3.2.1. Celulosa

La celulosa es el principal constituyente de la pared celular. Se trata de un homopolisacárido compuesto por unidades de D-glucosa unidos mediante enlaces β (1 \rightarrow 4) glucosídicos (Figura 2.12). El grado de polimerización (GP) medio de las celulosas nativas varía entre 8.000 y 10.000 unidades. Presenta una estructura lineal que facilita los enlaces de hidrógeno intra- e inter-moleculares entre los grupos hidróxilos, provocando la agregación de cadenas de celulosas en *fibrillas elementales* con un alto grado de cristalinidad. Estas *fibrillas elementales* se conforman con la unión de 30 a 100 cadenas de celulosa mediante puentes de hidrógeno. La agregación de éstas generan *microfibrillas*, que presentan una sección transversal de 10-30 nm, y éstas a su vez, *macrofibrillas*, con secciones de unos 500 nm. Esta estructura le confiere la insolubilidad en agua y en disolventes comunes como alcoholes, éteres, acetona, etc. (Windeisen y Wegener, 2009).

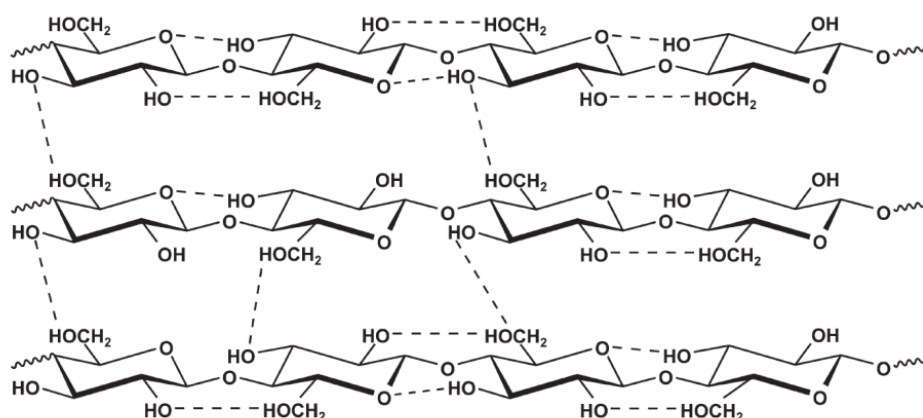


Figura 2.12. Estructura de la celulosa (Windeisen y Wegener, 2009).

Las cadenas poliméricas de la celulosa son asimétricas y presentan dos extremos distintos: un extremo reductor y un extremo no reductor, como se muestra en la Figura 2.13. La posición de estos extremos define la orientación de la cadena.

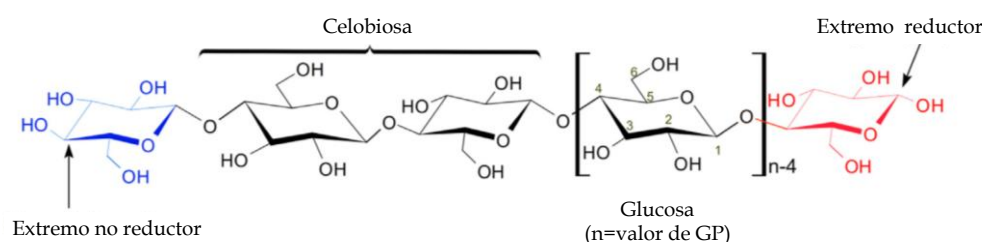


Figura 2.13. Estructura molecular de la celulosa con extremos reductor y no reductor (Trache y col., 2016).

La celulosa presenta diferentes formas polimórficas, diferenciadas por las dimensiones de la celda, la geometría, la orientación de la cadena y su polaridad. La forma natural de la celulosa es la cristalina, denominada como Celulosa I. A su vez se compone de dos tipos de celulosa: I_α y I_β . La primera de ellas es la predominante en algas; mientras que la segunda lo es en plantas como la madera. La modificación de la Celulosa I da lugar a Celulosa II, para ello se somete a tratamientos como la mercerización (tratamiento alcalino) o a través de la disolución y regeneración de la misma. La celulosa tipo II es termodinámicamente más estable y más amorfa que la tipo I. La principal diferencia entre los tipos I y II es la posición de sus cadenas de glucosa, la Celulosa I tiene las cadenas de forma paralela; mientras que la Celulosa II las tiene en orientación antiparalela. Otros tipos de celulosa según su forma cristalina son la Celulosa III y Celulosa IV, que se obtienen a través de tratamientos con amoníaco líquido o glicerol (Lavoine y col., 2012; Trache y col., 2016). La celulosa no es completamente cristalina, sino que presenta regiones amorfas que interrumpen el orden de su cadena longitudinal. Algunos estudios apuntan que las regiones desordenadas suponen solamente 4-5 monómeros de glucosa en una cadena de 300 unidades (Nishiyama y col., 2003).

2.3.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolisacárido que se compone de hexosas (glucosa, manosa y galactosa), pentosas (xilosa y arabinosa) y ácidos urónicos (glucurónico y 4-O-metil-glucurónico). A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa es un polímero amorfo, irregular y ramificado, cuyas cadenas presentan un grado de polimerización entre 50 y 250. Además, posee grupos laterales como los grupos acetilo. Debido a su estructura y composición química, este polímero sirve de enlace entre la lignina y la

celulosa en la pared celular (Windeisen y Wegener, 2009; Gírio y col., 2010; Peng y col., 2012). La composición de la hemicelulosa depende del tipo de biomasa. En la Tabla 2.3 se muestran los tipos de polisacáridos que componen la hemicelulosa indicando su origen biológico (tipo de biomasa), el porcentaje en peso que supone sobre la biomasa en base seca y el grado de polimerización que presenta.

Tabla 2.3. Tipos de polisacáridos presentes en las hemicelulosas (Peng y col., 2012).

Polisacárido	Origen biológico	% sobre biomasa	Grado de polimerización
Arabinogalactano	Madera blanda	5-35	10-600
Arabinoglucuronoxilano	Madera blanda y hierbas	5-10	50-185
Galactoglucomanano	Madera blanda	10-25	40-100
Glucomanano	Madera dura	2-5	40-70
Glucuronoarabinoxilano	Hierbas	2-15	-
Glucuronoxilano	Madera dura	15-30	100-200
Xiloglucano	Madera dura, blanda y hierbas	2-25	-

-: Datos no disponibles

En maderas blandas, los principales constituyentes son los galactoglucomananos, los arabinoglucuronoxilanos y los arabinogalactanos. Los más importantes son los galactoglucomananos, que pueden llegar a suponer el 25 % de la madera en base seca (Figura 2.14).

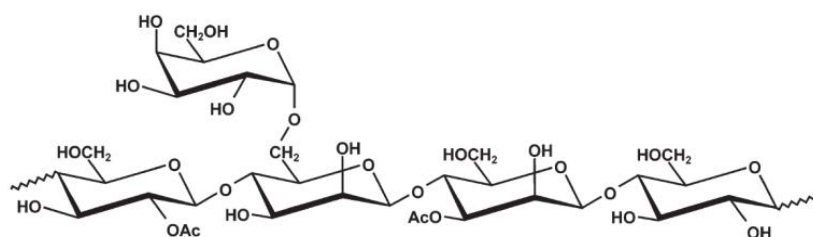


Figura 2.14 Glucomanano presente en maderas blandas (Windeisen y Wegener, 2009).

En maderas duras, los polisacáridos más frecuentes son los glucuronoxilanos, los glucomananos y los xiloglucanos. Si se refiere a monómeros, la manosa predomina en las maderas blandas y la xilosa en maderas duras (Figura 2.15).

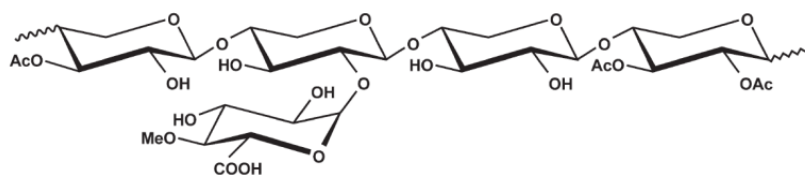


Figura 2.15. Xilano presente en maderas duras (Windeisen y Wegener, 2009).

En cuanto los grupos acetilo, las maderas duras tienen mayor contenido que las maderas blandas, por lo que liberan mayor cantidad de ácido acético durante los procesos de tratamiento (Windeisen y Wegener, 2009; Gírio y col., 2010; Peng y col., 2012).

2.3.2.3. Lignina

La lignina es el segundo polímero natural más abundante y uno de los recursos renovables más importantes. A nivel industrial, presenta multitud de aplicaciones como adsorbentes, adhesivos, dispersantes o aglutinantes (Oroumei y col., 2015). Este constituyente de la madera es un polímero amorfo y complejo que cementa las fibras de celulosa, proporciona la rigidez a la pared celular y actúa como barrera contra la degradación microbiana o fúngica de las fibras de celulosa. La lignina supone entre el 20 y el 35 % de la madera en base seca (Mohan y col., 2006; Ghose, 2011). Como se muestra en la Figura 2.16, está formada por monómeros de fenilpropano unidos por enlaces carbono-carbono o carbono-oxígeno. Sin embargo, la estructura química de la lignina aún no está definida, ya que varía dependiendo de su método de extracción.

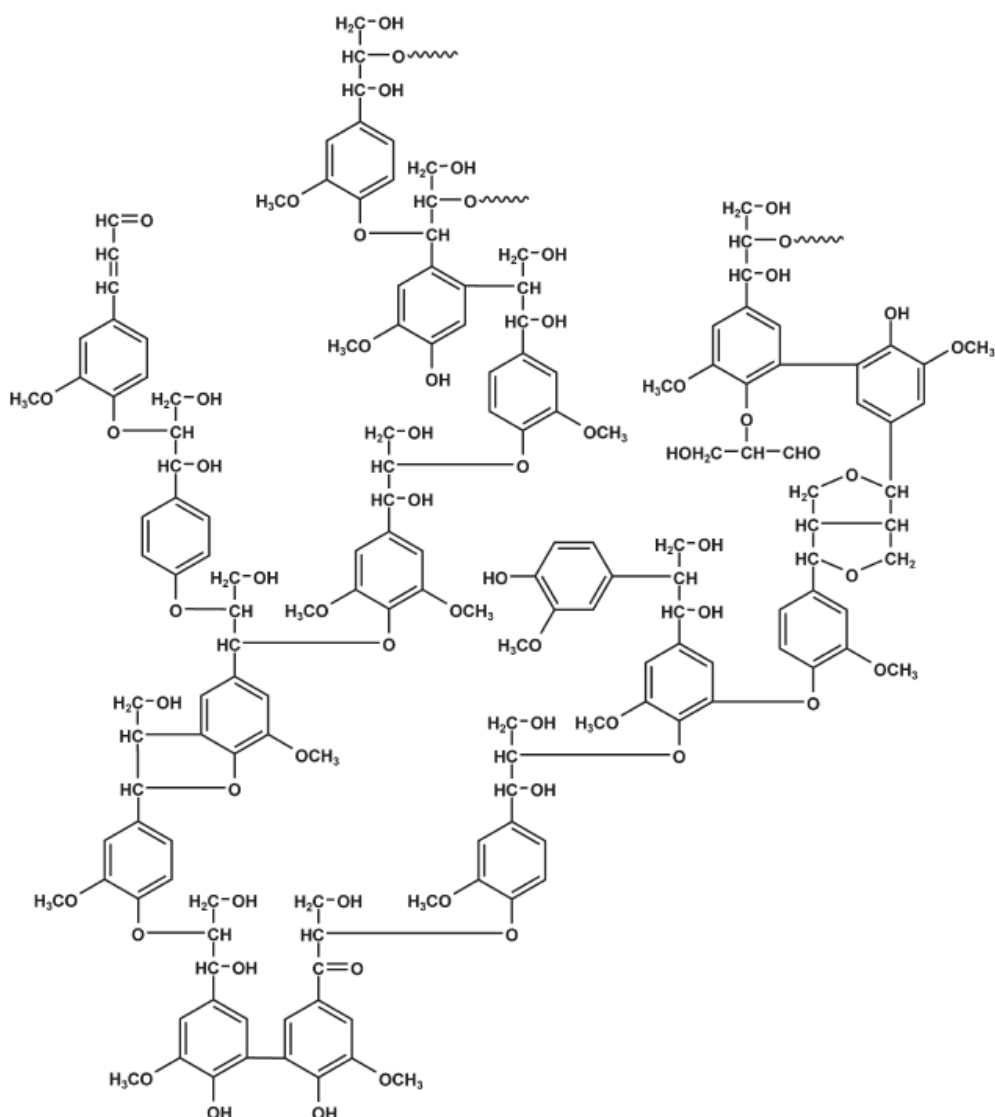


Figura 2.16. Estructura de la lignina de madera blanda (Windeisen y Wegener, 2009).

Las unidades monoméricas de fenilpropano difieren en el grado de sustitución del anillo aromático, siendo así los alcoholes cumarílicos (sin sustituir), los coniferílicos (con un grupo metoxilo) y los sinapílicos (con dos grupos metoxilos), como se recogen en la Figura 2.17. Dichos alcoholes dan lugar a unidades básicas denominadas p-hidroxifenilo, guayacilo y siringilo, respectivamente. Dependiendo del origen, la lignina tiene diferentes porcentajes de estas unidades básicas. Las maderas blandas contienen, principalmente, unidades de alcoholes coniferílicos, mientras que las maderas duras se componen de las unidades de alcoholes coniferílico y sinapílicos. El grado de entrecruzamiento en la lignina y, por tanto, la rigidez de la estructura van a depender del grado de sustitución (Windeisen y Wegener, 2009; Doherty y col., 2011).

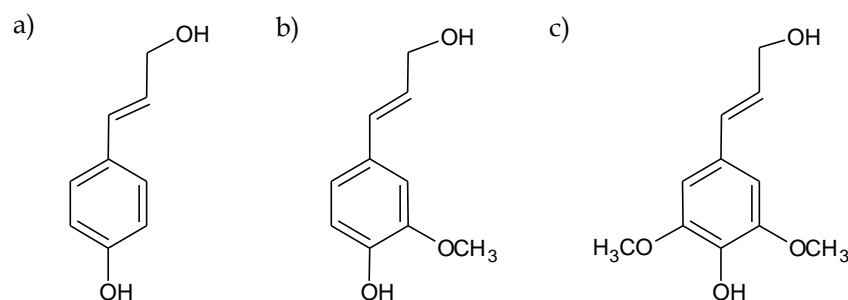


Figura 2.17. Precursores de la lignina: a) Alcohól p-cumarílico, b) Alcohól coniferílico y c) Alcohól sinapílico (Doherty y col., 2011).

La lignina posee diferentes tipos de enlaces covalentes que se distribuyen aleatoriamente a lo largo de su cadena. En la Tabla 2.4 se especifican los tipos de enlaces que presentan las maderas blandas y en qué proporción lo hacen.

Tabla 2.4. Proporción de tipos de enlaces en maderas blandas (Chakar y Ragauskas, 2004).

Tipo de enlace	Estructura del dímero	Madera blanda (%)
β -O-4	Fenilpropano β -aril éter	45-50
α -O-4	Fenilpropano α -aril éter	6-8
β -5	Fenilcumarán	9-12
5-5	Bifenil y dibenzodioxocin	18-25
4-O-5	Diaril éter	4-8
β -1	1,2-Diaril propano	7-10
β - β	Resinol	3

Los anillos aromáticos se conectan mediante enlaces carbono-carbono (C-C) ó carbono-oxígeno-carbono (C-O-C). El enlace más importante es el β -O-4 y se trata del más común entre las ligninas, llegando a suponer prácticamente la mitad de los enlaces presentes en este polímero. El otro enlace éter (C-O-C) que también conecta los anillos del fenilpropano es el enlace α -O-4. Finalmente, los enlaces C-C son β - β , β -5 y 5-5, que son más resistentes a los procesos (Henriksson y col., 2010). En la Figura 2.18 se muestran las uniones de las unidades de fenilpropano en la estructura de la lignina.

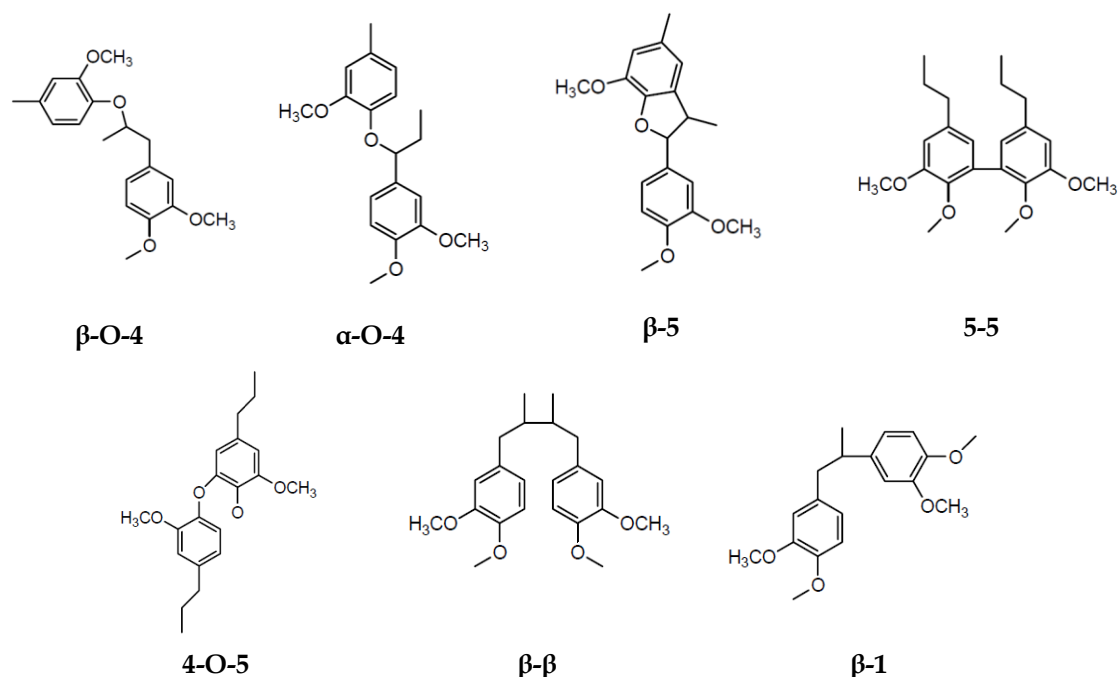


Figura 2.18. Uniones entre unidades de fenilpropano en la lignina (Sjöström, 1981; Chakar y Ragauskas, 2004).

El enlace β -O-4 es fundamental en la despolimerización y aislamiento de la lignina, ya que es el enlace intermolecular más frecuente presente en este polímero y su rotura se produce más fácilmente que la de otros tipos de enlaces durante los procesos químicos (Chakar y Ragauskas, 2004).

2.3.2.4. Extractos y cenizas

Los componentes minoritarios de la madera son los extractos y las cenizas. Los extractos suponen entre un 1 y un 10 % de la madera. Estos compuestos son muy variados, entre los que se incluyen: quinonas, grasas, aceites, terpenos, ceras y compuestos fenólicos como estilbenos, lignanos, flavonoides o taninos. Pueden ser extraídos con disolventes orgánicos tales como etanol, acetona, diclorometano o incluso agua (Sjöström, 1981).

Las cenizas se componen de sustancias inorgánicas que permanecen tras la incineración de la madera como potasio, calcio, magnesio o sodio. El contenido de cenizas supone entre 0,2 y 0,5 % en maderas de climas templados y se incrementa hasta el 1 % en maderas tropicales (Windeisen y Wegener, 2009).

2.3.3. Madera de *Pinus radiata*

El *Pinus radiata*, también conocido como pino insigne o pino de Monterrey, pertenece a la familia de las Pinaceas, género *Pinus*. Se trata de una especie originaria de California (Estados Unidos), pero es una de las más cultivadas a nivel mundial. Según datos del Inventario Forestal Nacional (IFM), España tiene aproximadamente 263.000 hectáreas de este tipo de árbol. País Vasco, Galicia y Asturias son las comunidades autónomas que mayor porcentaje presentan con un 47 %, 33 % y 9 %, respectivamente (Magrama, 2016).

El pino insigne es una especie de crecimiento rápido, que junto a la madera de eucalipto (*Eucalyptus Globulus*), son las fuentes de materia prima para la fabricación de la pasta de papel en España (ASPAPPEL, 2016). Se trata de una madera versátil y adecuada para diferentes aplicaciones industriales, ya que presenta un alto grado de homogeneidad y un buen comportamiento mecánico, por lo que se puede trabajar fácilmente con ella (Fernandez y Sarmiento, 2004).

Con respecto a la aplicación de esta materia prima en este trabajo, resulta fundamental conocer la composición química que presenta. En la Tabla 2.5 se muestra dicha composición según la base de datos de NREL.

Tabla 2.5. Composición de *Pinus radiata* (datos de NREL).

Componente	%
Ácidos urónicos	2,4
Arabinano	1,5
Cenizas	0,3
Extractos	2,7
Galactano	2,4
Glucano	41,7
Lignina	25,9
Manano	10,7
Xilano	5,9

En cuanto al análisis elemental, el porcentaje en masa de C, H, N, O y S es: 50,26 %, 5,98 %, 0,03 %, 42,14 % y 0,01 %, respectivamente.

3. PRETRATAMIENTOS DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

3. PRETRATAMIENTOS DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Debido a su naturaleza recalcitrante, los materiales lignocelulósicos deben ser sometidos a un pretratamiento para conseguir el fraccionamiento en sus polímeros constituyentes (celulosa, hemicelulosa y lignina), pudiendo éstos ser utilizados como precursores en biocombustibles y otros productos químicos. Además, el pretratamiento logra que estos materiales sean más susceptibles a la hidrólisis enzimática, mediante la alteración de la estructura y el incremento de porosidad (Figura 3.1).

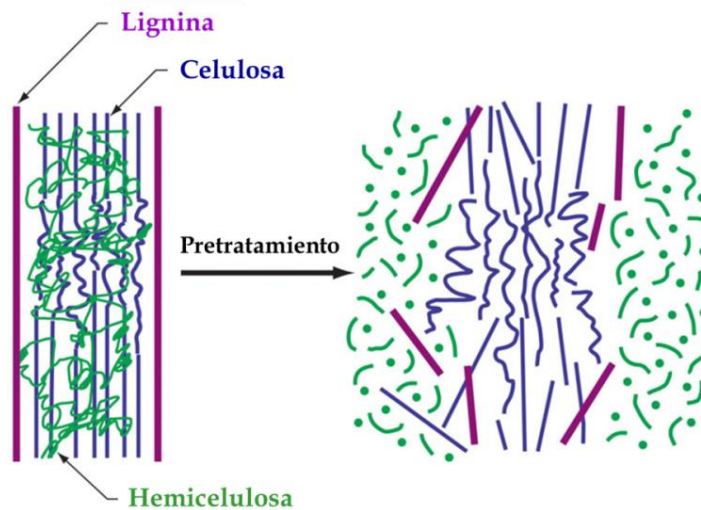


Figura 3.1. Esquema de pretratamiento (Kumar y col., 2009).

Para ser considerados efectivos, los pretratamientos de materiales lignocelulósicos deben cumplir una serie de requisitos, entre los que destacan (Galbe y Zacchi, 2007; Putro y col., 2016):

- Presentar una alta recuperación de los carbohidratos.
- Conseguir una alta digestibilidad de la celulosa en la hidrólisis enzimática.
- Generar poca cantidad de productos de degradación procedentes de la lignina o monómeros de celulosa y hemicelulosa. De tal forma, si se formara una corriente líquida, podría ser fermentada sin necesidad de someterla a una etapa de detoxificación.
- Trabajar con alta concentración de sólidos para obtener alta concentración de azúcares en la corriente final.
- Tener baja demanda de energía o que ésta pueda ser reutilizada en procesos secundarios.
- Presentar bajos costes de operación y de inversión inicial.

Sin embargo, no existe un pretratamiento ideal, ya que cada uno tiene asociadas unas ventajas e inconvenientes. Por tanto, para cada materia prima hay que estudiar y valorar cuál es más adecuado (Chandra y col., 2007).

En la Figura 3.2 se esquematizan los tipos de pretratamientos existentes que se comentan en los siguientes apartados, englobados en cuatro grandes grupos: físicos, químicos, físico-químicos y biológicos.

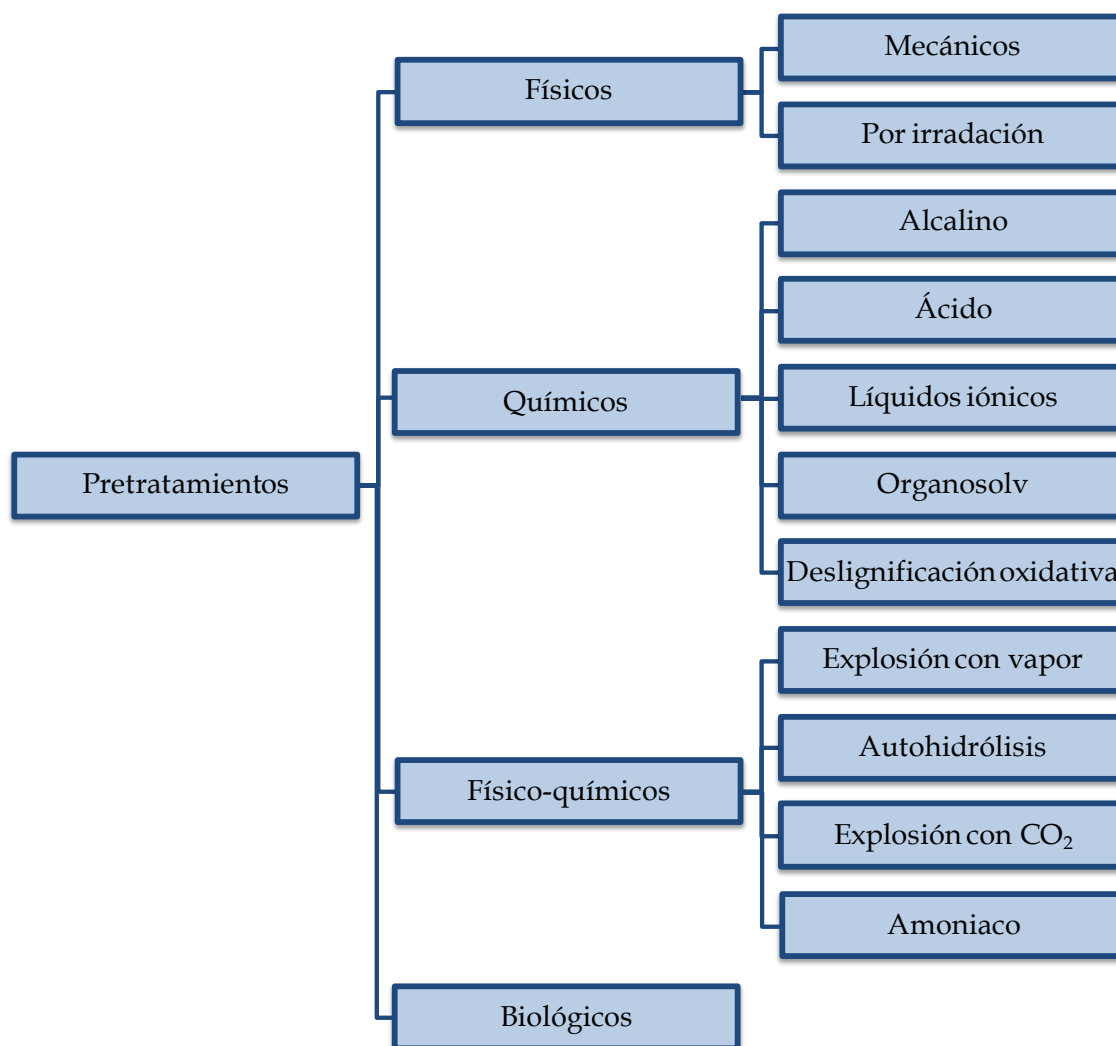


Figura 3.2. Esquema de pretratamientos para materiales lignocelulósicos.

A continuación se detallan los diferentes pretratamientos indicando las principales características, ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

3.1. Pretratamientos físicos

El objetivo de los pretratamientos físicos es incrementar el área superficial de los materiales lignocelulósicos mediante la reducción del tamaño partícula y la alteración de su estructura regular. La gran desventaja de este tipo de pretratamientos es la alta demanda de energía (Behera y col., 2014; Sun y col., 2016). Dentro de estos pretratamientos se diferencian dos grandes grupos: el pretratamiento mecánico y el pretratamiento por irradiación.

3.1.1. Pretratamiento mecánico

Existen diferentes procesos para disminuir el tamaño de partícula, como son el astillado, la trituración y la molienda. El objetivo de los mismos es fracturar la biomasa en pequeñas piezas, o incluso polvos, variándose los tamaños entre μm y mm . Esta reducción del tamaño de partícula, además de incrementar el área superficial, reduce el grado de polimerización y la cristalinidad de la celulosa. A pesar de ser un método efectivo para mejorar la digestibilidad enzimática, los grandes requerimientos de energía implican que no sea factible económicamente a nivel industrial. Por ello, este tipo de pretratamiento es, generalmente, una etapa previa que facilita otros pretratamientos posteriores, como puede ser la explosión con vapor (Sun y col., 2016).

3.1.2. Pretratamiento por irradiación

Los métodos por irradiación se dividen según el tipo de calefacción aplicada en: los rayos gamma, el haz de electrones o la radiación microondas. No se consideran pretratamientos en sí mismos, sino que acompañan a otro tipo de pretratamiento. De esta forma, mejoran su efectividad con respecto a la aplicación de una calefacción convencional (Casas y col., 2013; Sun y col., 2016). El uso de rayos gamma y haz de electrones consiste en la formación de especies activas, como radicales, que inician las reacciones químicas. En cuanto a la calefacción microondas, se basa en la vibración de las moléculas polares y movimiento de iones como respuesta a la radiación para generar calor (Singh y col., 2016).

3.2. Pretratamientos químicos

Los pretratamientos químicos son unos de los métodos más prometedores, ya que producen la mejora de la digestibilidad de la celulosa, mediante la eliminación de la lignina y/o hemicelulosa y la reducción del grado de polimerización y la cristalinidad de la celulosa (Behera y col., 2014). Existen diferentes tipos de pretratamiento en función de la naturaleza de los compuestos químicos aplicados, encontrando así pretratamientos alcalinos, ácidos, con líquidos iónicos, con solventes orgánicos (organosolv) o con agentes oxidantes (deslignificación oxidativa).

3.2.1. Pretratamiento alcalino

El pretratamiento alcalino consiste en someter a la biomasa a reactivos alcalinos como sosa, cal, potasa caustica, carbonato sódico o amoniaco anhidro. Entre los diferentes reactivos, los más prometedores son el hidróxido sódico y la cal (Sun y col., 2016). Su principal ventaja es la deslignificación de materiales lignocelulósicos, como maderas duras y residuos agrícolas. Sin embargo, es menos adecuado para el tratamiento de maderas blandas (Singh y col., 2016). El tratamiento alcalino también produce el hinchamiento de la celulosa, que se traduce en la reducción de su cristalinidad, mejorando así la digestibilidad durante la etapa de hidrólisis enzimática (Noori y Karimi, 2016). En comparación con el ácido, este pretratamiento presenta ventajas como no producir subproductos y presentar menos problemas de corrosión en los equipos (Singh y col., 2016).

3.2.2. Pretratamiento ácido

El pretratamiento ácido se basa en el tratamiento de la biomasa con un ácido mineral como sulfúrico, clorhídrico, fosfórico o nítrico. Es un proceso efectivo para conseguir una estructura adecuada del material lignocelulósico para su posterior hidrólisis enzimática. Su efecto principal es la solubilización de las hemicelulosas, ya que los enlaces glucosídicos son más susceptibles a la rotura por la presencia del ácido. Sin embargo, no presentan influencia sobre la lignina. El pretratamiento con ácidos diluidos (< 10 % de concentración y 100-200 °C) es uno de los más estudiados por su efectividad y bajo coste (Saha y col., 2005; Avci y col., 2013; Dagnino y col., 2013; Noparat y col., 2015). El principal inconveniente de este tipo de pretratamientos se debe al carácter tóxico y corrosivo de los ácidos, haciendo que el proceso requiera de reactores con materiales de construcción no metálicos o con aleaciones. Además, otro problema añadido es la generación de productos de degradación, que reduce la recuperación de azúcares e implica inhibición en etapas posteriores como la hidrólisis enzimática (Behera y col., 2014; Singh y col., 2016).

3.2.3. Pretratamiento con líquidos iónicos

El pretratamiento con líquidos iónicos se basa en el tratamiento de los materiales lignocelulósicos con estos disolventes. Los líquidos iónicos se componen de un catión orgánico y un anión inorgánico. Se consideran “disolventes de diseño”, ya que se pueden modificar sus propiedades físicas y químicas según la selección de sus iones. Sin embargo, como características generales, presentan alta estabilidad térmica y despreciable presión de vapor (Yang y col., 2010). Se han utilizado para disolver diferentes materiales lignocelulósicos. En el caso de la madera, los mejores son el acetato de 1-etil-3-metilimidazolio (EmimAc), el cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio (BmimCl) y el cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio (AmimCl) (Kilpeläinen y col., 2007; Sun y col., 2009). El tratamiento consiste en una primera etapa de disolución de la biomasa en el líquido iónico y una segunda etapa de regeneración del material disuelto, al añadir un antidisolvente (agua, acetona, metanol). Las principales ventajas que ofrece este pretratamiento es la pérdida de cristalinidad de la celulosa y, por tanto, un incremento de área superficial que favorece la posterior hidrólisis enzimática (Zhao y col., 2009). El gran inconveniente de este tipo de disolventes es su coste, por lo que se presenta imprescindible su recuperación y reutilización para que el proceso sea viable desde el punto de vista económico (da Costa Lopez y col., 2013; Torr y col., 2016).

3.2.4. Organosolv

El pretratamiento organosolv consiste en el tratamiento de los materiales lignocelulósicos con disolventes orgánicos como el metanol, el etanol, la acetona, el etilenglicol o el glicerol, entre otros (Li y col., 2016; Zhang y col., 2016a). El objetivo principal es conseguir la eliminación de la lignina de la biomasa. Las ventajas que presenta este pretratamiento son la recuperación de la lignina extraída con alta pureza y la facilidad de recuperación de los disolventes usados mediante destilación. Este pretratamiento se describirá en detalle en el apartado 3.7.

3.2.5. Deslignificación oxidativa

La deslignificación oxidativa engloba a aquellos procesos en los que se utilizan agentes oxidantes como O_3 , O_2 , H_2O_2 , ClO_2 , $NaClO$ o Cl_2 (Sun y col., 2016). Durante el tratamiento, los agentes liberan radicales libres que favorecen la extracción de la lignina de la biomasa lignocelulósica, que se libera en forma de ácidos. Estos ácidos se consideran productos de inhibición para los pasos posteriores. Además, la hemicelulosa también se ve afectada y en gran medida también se convierte en productos de degradación. Por tanto, este pretratamiento requiere una paso de eliminación de estos productos de degradación para que etapas posteriores del proceso como la hidrólisis o la fermentación no sean perjudicadas (Chaturvedi y Verma, 2013). Entre los principales tipos de deslignificación oxidativa se encuentran:

- *Pretratamiento mediante ozonólisis.* Este método se basa en el empleo de ozono como disolvente. Se favorece la degradación de la lignina de la biomasa, mediante el ataque a las estructuras aromáticas de los anillos; mientras que la celulosa y la hemicelulosa no se ven alteradas. Sus grandes ventajas son la producción limitada de productos de degradación, como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), y que sus condiciones de trabajo son moderadas (temperatura ambiente y presión normal). El principal inconveniente que presenta es el alto coste que impide su uso a gran escala, ya que se trabaja con gran cantidad de ozono (Chaturvedi y Verma, 2013; Singh y col., 2016).
- *Pretratamiento con peróxido de hidrógeno.* Este agente oxidante (H_2O_2) es el más común en este tipo de pretratamientos. Mediante la generación de radicales hidróxilo permite la degradación de la lignina en compuestos de bajo peso molecular. La eliminación de la lignina de la biomasa produce la exposición de la celulosa a las enzimas (Chaturvedi y Verma, 2013).
- *Pretratamiento mediante oxidación húmeda.* Se trata de la oxidación de la materia orgánica en presencia de oxígeno. Los agentes que se utilizan son oxígeno o aire en combinación con agua a elevadas temperaturas (180-200 °C). Durante el proceso, la hemicelulosa se solubiliza y la lignina se degrada en dióxido de carbono, agua y ácidos carboxílicos como succínico, acético o compuestos

fenólicos, la celulosa queda remanente en el sólido para ser hidrolizada enzimáticamente (Chaturvedi y Verma, 2013).

3.3. Pretratamientos físicos-químicos

Los pretratamientos físico-químicos son aquellos que combinan tanto procesos químicos como físicos implicando la disolución de las hemicelulosas y la alteración de la estructura de la lignina; mejorando así la accesibilidad de las enzimas a la celulosa. En esta categoría se incluyen los pretratamientos como la explosión con vapor, la autohidrólisis, el pretratamiento con amoníaco o con CO₂ supercrítico.

3.3.1. Explosión con vapor

La explosión de vapor es uno de los métodos más comunes en el pretratamiento de la biomasa. El proceso consiste en dos etapas: en una primera el material se somete a vapor saturado a alta presión y alta temperatura durante un corto periodo de tiempo (segundo o minutos) y una segunda etapa donde la presión se reduce rápidamente hasta alcanzar la presión atmosférica. Las condiciones a las que se lleva a cabo el proceso varían entre los 140 y 240 °C de temperatura y entre los 3 y 32 bares de presión (Shamsudin y col., 2012; Martín-Sampedro y col., 2012; Pielhop y col., 2016a). De esta forma, la hemicelulosa y la lignina pueden ser eliminadas. Si las condiciones son muy severas, se forman compuestos aromáticos y productos de degradación, necesitando una etapa de detoxificación previa a las etapas siguientes. También, se han añadido catalizadores como SO₂ y H₂SO₄ a fin de reducir las condiciones de operación y recuperar la fracción hemicelulósica sin degradar (Sun y col., 2016).

3.3.2. Autohidrólisis

La autohidrólisis, también conocida como pretratamiento hidrotérmico o con agua caliente líquida, emplea agua como único disolvente para tratar los materiales lignocelulósicos, sin adición de ningún catalizador. Su objetivo es la solubilización de los productos obtenidos por la despolimerización de las hemicelulosas (Ruiz y col., 2011; Buruiana y col., 2014). Sus ventajas principales son la baja erosión de los equipos

y la limitada formación de productos de inhibición. Este pretratamiento se describirá en profundidad en el apartado 3.6.

3.3.3. Explosión de CO₂

En este tipo de tratamiento se trabaja con CO₂ en estado supercrítico a altas presiones ($T_C = 31\text{ °C}$ y $P_C = 73\text{ bar}$). En este estado, el dióxido de carbono no tiene tensión superficial y presenta baja viscosidad, por lo que es capaz de penetrar en la biomasa y romperla cuando se libera la presión. Como consecuencia, la estructura de la biomasa se altera, incrementando el área superficial accesible y facilitando así la digestibilidad de la celulosa. Además, se produce la formación de ácido carbónico por la reacción entre el agua y el dióxido de carbono, que favorece la hidrólisis de las hemicelulosas. Entre las ventajas que presenta, destacan la no generación de productos de degradación, el bajo coste del CO₂ y las bajas temperaturas de operación. Sin embargo, tiene la limitación del alto coste de los equipos para operar bajo presiones elevadas (Behera y col., 2014; Putro y col., 2016).

3.3.4. Pretratamiento con amoníaco

Este pretratamiento se basa en el empleo de amoníaco líquido a altas temperaturas para alterar la biomasa. Su objetivo principal es la eliminación de hemicelulosa y lignina, mientras se consigue la descristalización de la celulosa. Dentro de este pretratamiento, existen tres variantes:

- *Percolación de amoníaco reciclado (ARP, Ammonia Recycle Percolation)*: Este tratamiento se lleva a cabo en un reactor donde el amoníaco fluye a través de la biomasa. Tras la percolación, el amoníaco se recupera y reutiliza. Durante el proceso, se produce la solubilización de las hemicelulosas y la eliminación de la lignina (Chaturvedi y Verma, 2013).
- *Explosión con amoníaco (AFEX, Ammonia Fiber Explosion)*: Consiste en el tratamiento del material lignocelulósico con amoníaco líquido, usando temperaturas entre los 60 y 100 °C y presiones altas comprendidas entre los 15 y 20 bares. Tras un corto periodo de tiempo (minutos), se realiza una rápida despresurización. Como consecuencia del tratamiento se produce el

hinchamiento del material y el cambio de cristalinidad de la celulosa del tipo I a tipo II. A pesar de eliminar pequeñas cantidades de lignina y hemicelulosa, se consigue mejorar la etapa de la hidrólisis enzimática, debido a la alteración física de la estructura de la biomasa y a la rotura de los enlaces entre la celulosa y la lignina (Behera y col., 2014; Sun y col., 2016).

3.4. Pretratamientos biológicos

Los pretratamientos biológicos son aquellos que usan la acción de hongos capaces de generar enzimas que degradan la lignina, las hemicelulosas y los polifenoles presentes en la biomasa. Se han utilizado diferentes hongos en este tipo de pretratamientos: de podredumbre blanca, marrón y blanda, actuando cada uno sobre una fracción de los materiales lignocelulósicos (Putro y col., 2016). Entre ellos, los más usados son los hongos de podredumbre blanca que se utilizan en la degradación de la lignina, como son *Phanerochaete crysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoletus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* o *Pleurotus ostreatus*. Éstos liberan ciertas enzimas altamente oxidativas que afectan a la lignina, como son la lacasa, la lignina peroxidasa o la manganeso peroxidasa (Sun y col., 2016). La gran limitación de estos pretratamientos a escala industrial son los largos tiempos de residencia (10-14 días) y, en algunos casos, los propios microorganismos consumen parte de la fracción de carbohidratos (Singh y col., 2016).

3.5. Selección y justificación de pretratamientos

Los pretratamientos seleccionados para la realización de esta Tesis Doctoral son la autohidrólisis (hidrotérmico) y el organosolv. Dichos pretratamientos se han elegido en vistas a llevar a cabo un fraccionamiento del material de partida e intentar conseguir un sólido rico en celulosa que pueda ser hidrolizado enzimáticamente. Estos pretratamientos, además de la eliminación selectiva de ciertos componentes de los materiales lignocelulósicos, permiten que éstos puedan ser recuperados para su posterior aprovechamiento. Así pues, en el caso de la autohidrólisis se extraen las hemicelulosas que quedan solubilizadas en la fase líquida utilizada (agua), mientras

que el tratamiento organosolv permite la separación y la recuperación de la lignina de alta pureza.

En la Tabla 3.1 se muestra una comparativa con las principales ventajas y desventajas de los diferentes pretratamientos que se pueden llevar a cabo sobre los materiales lignocelulósicos, donde se incluyen los seleccionados en este trabajo.

Tabla 3.1. Ventajas y desventajas de los diferentes pretratamientos (Sun y col., 2016)

Pretratamiento	Ventajas	Desventajas
Mecánico	Incremento del área superficial accesible y reducción de la cristalinidad	Alto consumo de energía
Alcalino	Reducción del contenido de lignina y hemicelulosas	Alta contaminación y alto coste de recuperación de disolventes
Ácido	Reducción del contenido en hemicelulosas	Problemas en la recuperación de productos químicos
Líquidos iónicos	Reducción de la cristalinidad de la celulosa	Alto coste de los líquidos iónicos
Organosolv	Eliminación y recuperación de lignina de alta calidad	Alto coste de los disolventes orgánicos
Designificación oxidativa	Eliminación de lignina	Alto coste de agentes de blanqueo
Explosión con vapor	Solubilización de hemicelulosas y alteración de la estructura de lignina	Alto coste de equipos y generación de inhibidores
Hidrotérmico	Solubilización de hemicelulosas y recuperación de sus azúcares	Alto coste de equipos
Explosión con CO ₂	Incremento del área superficial accesible	Alto coste de equipos
AFEX	Hinchamiento de celulosa e incremento del área superficial accesible	Alto coste de equipos y amoníaco
Biológico	Degradación de lignina y hemicelulosas	Largos tiempos de pretratamiento

3.6. La autohidrólisis como pretratamiento

El objetivo de los tratamientos hidrotérmicos (autohidrólisis) es la hidrólisis selectiva de las hemicelulosas de los materiales lignocelulósicos. Desde el punto de vista medioambiental y económico, son muy atractivos, porque se llevan a cabo sin la adición de catalizadores químicos. En ocasiones, se engloba al pretratamiento con explosión con vapor dentro de este grupo (Gírio y col., 2010).

Este tipo de pretratamientos se pueden llevar a cabo bajo dos modos de operación: isoterma (alcanzar la temperatura de tratamiento y mantenerla) o no isoterma (llegar a la temperatura de tratamiento y enfriar el reactor) (Romaní y col., 2011; Huijgen y col., 2012; Ertas y col., 2014; Li y col., 2014a). El perfil de temperatura del reactor en estos dos modos se recoge en la Figura 3.3.

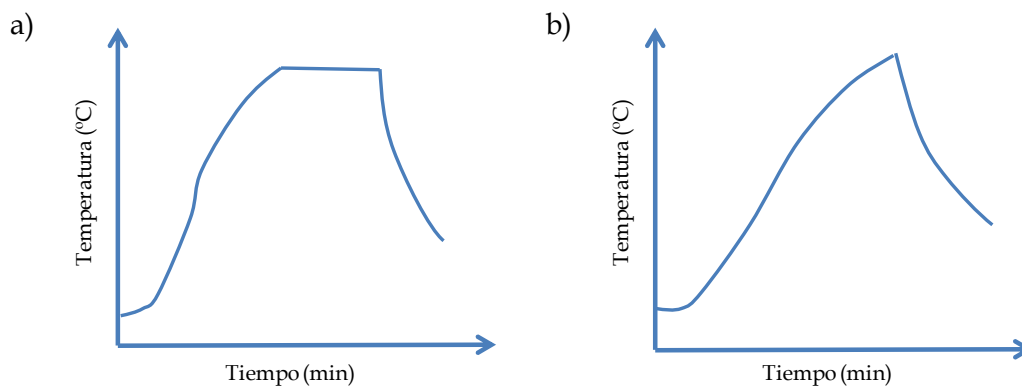


Figura 3.3. Modo de operación en pretratamientos hidrotérmicos: a) Isoterma y b) No isoterma (Ruiz y col., 2013).

Para poder comparar los pretratamientos realizados bajo diferentes condiciones de operación, se define el factor de severidad (S_0), un número adimensional que depende de la temperatura y el tiempo, que se calcula mediante diferentes ecuaciones matemáticas según el modo de operación. La ecuación [3.1] se aplica a los procesos isotermos, mientras que la ecuación [3.2] se emplea para los no isotermos.

$$S_0 = \log R_0 = \log \left[\int_0^t \exp \left(\frac{T-100}{14,75} \right) dt \right] \quad [3.1]$$

donde t es el tiempo expresado en minutos, T la temperatura del tratamiento en °C, 100 es la temperatura de referencia y el valor de 14,75 es un parámetro empírico relacionado con la energía de activación (Ruiz y col., 2013).

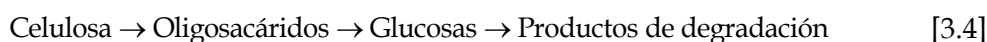
$$S_0 = \log R_0 = \log [R_{0\text{calefacción}} + R_{0\text{enfriamiento}}] = \log \left[\int_0^{t_{\max}} \exp\left(\frac{T(t)-100}{\omega}\right) dt + \int_{t_{\max}}^{t_F} \exp\left(\frac{T'(t)-100}{\omega}\right) dt \right] \quad [3.2]$$

siendo t_{\max} el tiempo de calefacción necesario para alcanzar la temperatura del proceso, t_F el tiempo total de calefacción y enfriamiento, ambos en minutos, $T(t)$ y $T'(t)$ son los perfiles de temperatura en estos dos periodos, 100 es la temperatura de referencia y ω es un parámetro empírico cuyo valor es de 14,75 (Romaní y col., 2010; Li y col., 2014a).

Las temperaturas más habituales en el proceso de autohidrólisis se encuentran en el intervalo entre los 150 y 230 °C y la relación líquido-sólido entre 2 y 100, aunque el valor más frecuente es 10 (Ruiz y col., 2011; Obama y col., 2012; Buruiana y col., 2014). El mecanismo de reacción está basado en la actuación de los iones hidronio (H_3O^+), procedentes del agua y del ácido acético, como catalizadores. Los iones hidronio del agua se generan por la reacción de autoionización de la misma. El ácido acético es el resultado de la liberación de los grupos acetilo durante la hidrólisis de las hemicelulosas de la biomasa (Gírio y col., 2010; Ertas y col., 2014; Batalha y col., 2015).

Este pretratamiento tiene como resultado una alta recuperación de hemicelulosas del material de partida, ya que se solubiliza entre un 50 y un 90 % de este polímero en la corriente líquida (El Hage y col., 2010; Ruiz y col., 2011; Obama y col., 2012; Timilsena y col., 2013; Vallejos y col., 2015). Sin embargo, dicha corriente presenta parte de la hemicelulosa solubilizada en forma de oligómeros, por lo que supone un inconveniente para usarla en la fermentación hacia biocombustibles como etanol. En cuanto a la fase sólida obtenida, la eliminación de la celulosa y la lignina durante este pretratamiento es muy reducida (Krogell y col., 2013; Silva-Fernandes y col., 2015). Dicha fase puede tener múltiples aplicaciones, pero una de las más prometedoras es su aplicación para la hidrólisis enzimática (Gírio y col., 2010).

La descomposición de las hemicelulosas durante el tratamiento hidrotérmico se puede dividir en tres etapas: 1) las reacciones en la superficie de la biomasa para liberar productos primarios; 2) la disolución de los productos primarios en el agua y 3) la descomposición de estos productos primarios (Zhuang y col., 2016). El desarrollo del modelo cinético de estos pretratamientos permite profundizar en los fenómenos que ocurren. Generalmente, los modelos propuestos se basan en cinéticas de pseudoprimer orden, como muestran las reacciones [3.3] y [3.4] para la hemicelulosa y la celulosa, respectivamente (Ruiz y col., 2013).



El esquema de degradación de la celulosa y la hemicelulosa de la madera blanda que se produce en la fase líquida se muestra en la Figura 3.4.

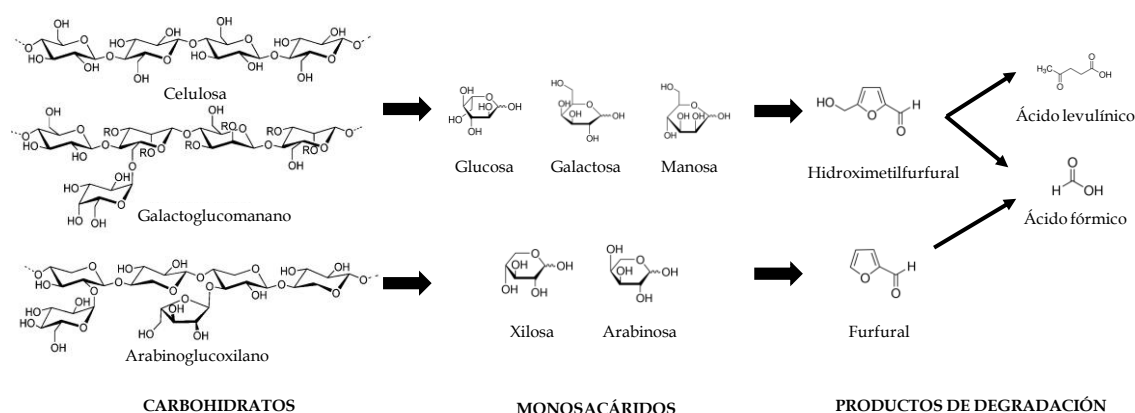


Figura 3.4. Esquema de degradación de celulosa y hemicelulosas de madera blanda (Adaptado de Marzioletti y col., 2008).

En primer lugar se produce la despolimerización de la celulosa y la hemicelulosa que da lugar a los correspondientes oligosacáridos y monosacáridos solubles. Los monosacáridos se deshidratan a sus correspondientes furanos. Las hexosas (glucosa, manosa y galactosa) se descomponen por deshidratación a hidroximetilfurfural (HMF); mientras que las pentosas (xilosa y arabinosa) se degradan a furfural por la pérdida de tres moléculas de agua. Estos productos de degradación a su vez se pueden convertir en ácidos bajo condiciones más severas. El HMF en presencia de agua se transforma en

ácido levulínico y ácido fórmico; mientras que el furfural lo hace a ácido fórmico (Marzioletti y col., 2008; Zakaria y col., 2015; Rivas y col., 2016).

A pesar de que el contenido en celulosa y lignina permanezca normalmente constante durante el tratamiento de autohidrólisis, se ha estudiado el cambio químico que se produce en la lignina en ciertos materiales lignocelulósicos. Ko y col. (2015) estudiaron el efecto del pretratamiento de autohidrólisis (agua caliente líquida) en una madera blanda, la píce. En este estudio comprobaron que al aumentar la severidad del tratamiento, se incrementaba la temperatura de transición vítrea de la lignina. Esto se debe a que durante el tratamiento hidrotérmico, se produce la despolimerización de la lignina por la rotura de los enlaces éteres y la posterior condensación de la misma por la formación de nuevos enlaces C-C que la hacen más rígida y menos reactiva.

La condensación de la lignina durante el pretratamiento de autohidrólisis viene producida por las reacciones de repolimerización. Cuando los ácidos orgánicos se generan, por ejemplo el ácido acético por la liberación de los grupos acetilo de las hemicelulosas, se reduce el pH del medio hasta valores comprendidos entre 2 y 4. Bajo estas condiciones ácidas, se forman los llamados iones carbonio ó carbocationes a partir de las moléculas de lignina. Estos carbocationes son productos intermedios en las reacciones de despolimerización, especialmente en la rotura de los enlaces β -aril éter. Además, estos carbocationes electrofílicos pueden formar enlaces carbono-carbono con los átomos ricos en electrones de los anillos aromáticos de la lignina. De esta forma, se crean estructuras de lignina repolimerizada con alto peso molecular. En la Figura 3.5 se muestra las dos posibles reacciones de la lignina tras la formación del carbocatión en presencia de un medio ácido: la reacción de despolimerización y de repolimerización (Pielhop y col., 2015).

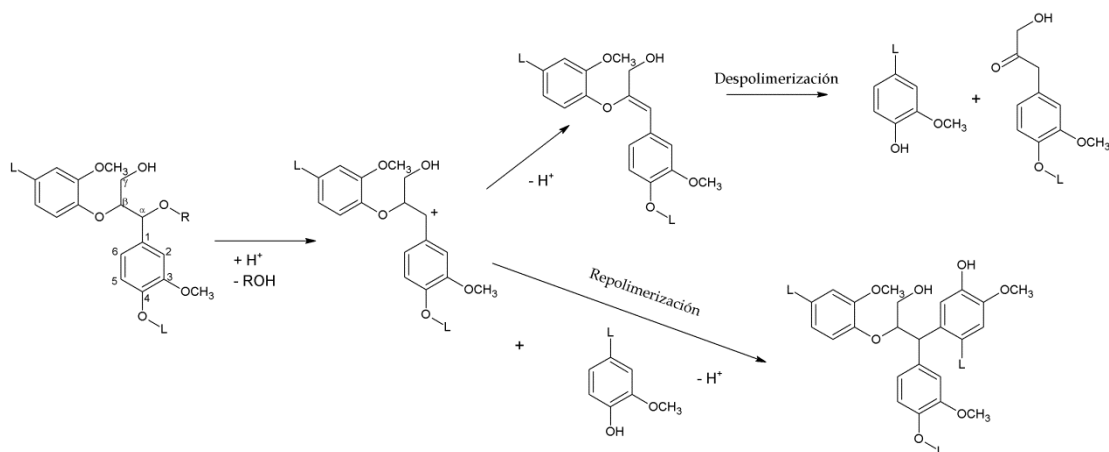


Figura 3.5. Esquema de reacción de la lignina en medios ácidos (Pielhop y col., 2015).

Se considera que los anillos guayacilo son más favorables a este tipo de reacciones de polimerización. Cuando la relación de anillos siringilo/guayacilo de la lignina son muy bajos, la rotura de los enlaces existentes resulta más complicada (menor proporción de β -O-4 y mayor 5-5 y β -5).

3.6.1. Autohidrólisis como proceso de pre-extracción

Este proceso hidrotérmico se ha aplicado como una etapa de pre-extracción para recuperar las hemicelulosas de los materiales lignocelulósicos antes de ser sometidos a otras etapas como el proceso Kraft, el pulpeo quimi-termomecánico o el pulpeo con sosa-antraquinona. A continuación, se detallan estos procesos.

- En el proceso Kraft es habitual que las hemicelulosas sean quemadas como parte de las lejías negras, a pesar de su bajo poder calorífico (13,6 MJ/kg). Por ello, la extracción de estas hemicelulosas como etapa previa puede suponer una revalorización de las mismas al transformarlas en productos con valor añadido. Sin embargo, se debe encontrar las condiciones óptimas en las cuales la pasta de papel no pierda sus propiedades, ya que la presencia de hemicelulosas también le aporta calidad (Cabrera y col., 2016). Martín-Sampedro y col. (2011) estudiaron la influencia de esta pre-extracción sobre el proceso Kraft de una madera dura, *Eucalyptus globulus*.
- En el proceso del pulpeo quimi-termomecánico (CTMP, *Chemi-termomechanical pulping*), las astillas de madera se tratan con productos químicos y vapor, para

posteriormente molerlas en un refinador y conseguir su desfibrilación. A pesar de sus altos rendimientos en el proceso, existe una cantidad de material disuelto que se pierde, que podría ser recuperada mediante la autohidrólisis, siempre que cause la mínima interferencia en el proceso de pulpeo. Hou y col. (2014) estudiaron la pre-extracción de hemicelulosas de una madera dura (álamo) y observaron que tras esta etapa, las fibras de la pasta tendían a enlazarse más, mejorando propiedades como el índice de tracción o estallido; sin embargo, éstas eran más frágiles y débiles.

- En el pulpeo con sosa-antraquinona, la producción de pasta de papel se lleva a cabo en medio alcalino, con sosa como disolvente y añadiendo antraquinona como catalizador para mejorar la deslignificación. Loaiza y col. (2016) optimizaron las condiciones de la etapa de pulpeo, partiendo de unas condiciones fijas para la etapa de pre-extracción en una madera dura (eucalipto). Las condiciones de operación en la autohidrólisis (180 °C, 30 min y una relación líquido/sólido igual a 8/1 en peso) se seleccionaron en base a dos aspectos para alcanzar una situación de compromiso: que la recuperación de hemicelulosas generara una corriente para uso comercial y que la extracción de estas hemicelulosas no fuera excesiva, traduciéndose en una pérdida de calidad en el papel. En este estudio se obtuvieron propiedades de la pasta mejores en cuanto a índice Kappa, viscosidad, contenido en glucano y xilano e índice de tracción, cuando se incluía la etapa de autohidrólisis. Además, en la etapa de deslignificación, las condiciones requeridas eran más suaves que sin la pre-extracción.

La integración de esta etapa de pre-extracción en los sistemas de pulpeo resulta clave en el desarrollo del concepto de “biorrefinería forestal integrada” (IFBR, de sus siglas en inglés *integrated forest biorefinery*). De esta forma, la industria de la pasta y el papel presentan la posibilidad de generar de forma adicional productos químicos de valor añadido, continuando con su procesado tradicional (Hou y col., 2014).

3.6.2. Métodos de purificación y separación de hemicelulosas

Una cuestión clave en la utilización de las hemicelulosas extraídas mediante un proceso de autohidrólisis es la pureza de las mismas. La presencia de compuestos procedentes de la despolimerización de lignina o productos de degradación de los carbohidratos dificultarían el aprovechamiento de los azúcares derivados de las hemicelulosas. En bibliografía se han propuesto diferentes métodos para eliminar estos compuestos no deseados, como son la cromatografía de gel, la filtración con membrana, la extracción con etanol, la precipitación polimérica o la nano y la ultrafiltración, siendo estas últimas las más empleadas.

Actualmente, se está estudiando la combinación de varias técnicas de purificación. Por ejemplo, llevando a cabo la eliminación de las impurezas de lignina de mayor tamaño con un tratamiento con cal; seguido de la extracción de los compuestos fenólicos mediante una resina de intercambio iónico y de los furanos (furfural e hidroximetilfurfural) con filtración en gel; se alcanzan altas eliminaciones de impurezas (94 %), junto con recuperaciones de hemicelulosas en forma oligosacáridos y monosacáridos del 81 % (Wang y col., 2015a). Otra opción es la extracción de hemicelulosas mediante precipitación escalonada de las mismas. Se realiza aplicando los diferentes solventes (etanol, acetona y MTBE) y se consigue así su purificación y su separación por tamaños (Pranovich y col., 2016).

3.6.3. Aprovechamiento de las hemicelulosas extraídas

Durante la autohidrólisis, parte de las hemicelulosas se liberan en forma de oligosacáridos que no pueden ser utilizados directamente en aplicaciones posteriores, como puede ser la fermentación a alcoholes. Para obtener una corriente rica en hemicelulosas en forma de monómeros y maximizar el rendimiento de recuperación de azúcares, se ha planteado tratamientos en dos etapas secuenciales. En la primera de ellas, se somete al material lignocelulósico a una etapa de autohidrólisis para liberar las hemicelulosas de este sólido. Posteriormente, la fase líquida recuperada vuelve a ser sometida a una etapa de hidrólisis para conseguir la rotura de los oligómeros a monómeros.

Gonzalez-Muñoz y col. (2012) sometían a la fase líquida obtenida en la autohidrólisis de una especie de madera blanda (*Pinus pinaster*) a una etapa posterior de hidrólisis con ácido sulfúrico diluido al 4 %. De esta forma, durante la autohidrólisis, la celulosa de la materia prima inicial no se degradaba a glucosa al no ser sometido a condiciones severas. En la segunda etapa se convertían las hemicelulosas, solubilizadas durante la primera etapa, a su forma monomérica. En estudios posteriores de este grupo, las fases prehidrolizadas se sometían a mayores temperaturas en la segunda etapa de hidrólisis (130-250 °C) y se determinaron las cinéticas de la reacción. De esta forma, se podían seleccionar las condiciones más adecuadas para obtener mayor conversión hacia un producto específico, como el ácido levulínico (Rivas y col., 2014).

3.7. Pretratamiento organosolv

Los pretratamientos de materiales lignocelulósicos llevados a cabo con disolventes orgánicos se denominan procesos organosolv. Inicialmente, estos pretratamientos fueron estudiados como alternativa al proceso Kraft dentro del contexto de la industria de la pasta y el papel (Oliet y col., 2002). Sin embargo, han emergido como una prometedora forma de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para facilitar el fraccionamiento y mejorar su conversión enzimática (Hallac y col., 2010a; Park y col., 2010; Huijgen y col., 2011; Lai y col., 2014; Jang y col., 2016; Zhang y col., 2016b). La principal característica de los pretratamientos con disolventes orgánicos es la obtención de estos tres productos:

- Celulosa con alta pureza. El sólido final tras el pretratamiento se compone principalmente por celulosa, ya que la lignina y hemicelulosa se disuelven en el proceso. Además, la extracción de estos compuestos provoca un incremento del área superficial de la celulosa y, por tanto, de accesibilidad que favorece la hidrólisis enzimática posterior (Zhang y col., 2016a).
- Lignina de alta calidad. La disolución de este polímero y su posterior recuperación en este pretratamiento consigue una lignina con determinadas propiedades, tales como estar libre de sulfuros, tener un intervalo de pesos moleculares o repelencia al agua, que permiten su uso en múltiples aplicaciones. El empleo de ellas como

antioxidantes, dispersantes, en espumas de poliuretano y resinas epoxi son algunos ejemplos (Sun y col., 2016).

- **Hemicelulosa.** Este heteropolímero se solubiliza en forma de oligosacáridos, monosacáridos y ácido acético.

Una limitación del pretratamiento organosolv es el alto coste y los peligros potenciales que van asociados a la utilización de grandes volúmenes de los disolventes orgánicos (Sun y col., 2016). Una amplia variedad de estos disolventes han sido estudiados, pudiéndose clasificar en estos grupos (Li y col., 2016; Zhang y col., 2016a):

- **Alcoholes alifáticos de cadena corta:** se caracterizan por su bajo punto de ebullición, bajo coste y fácil recuperación, como son el etanol y el metanol.
- **Alcoholes polihídricos o polioles:** son aquellos que presentan un alto punto de ebullición, requieren bajas temperaturas y presiones de operación, pero su recuperación necesita altos consumos de energía. Destacan el glicerol y el etilenglicol.
- **Ácidos orgánicos:** pueden ser usados a presión atmosférica, pero presentan grandes desventajas como la corrosión y la acetilación o formilación de la celulosa, requiriendo así etapas posteriores de purificación. En la Tabla 3.2 se recogen algunos procesos que utilizan este tipo de disolventes.

Tabla 3.2. Procesos organosolv con ácidos orgánicos como pretratamiento (Wang y col., 2011; Cui y col., 2014; Vila y col., 2014; Chen y col., 2015; Zhang y col., 2016a).

Proceso	Disolvente	Catalizador	Tratamiento posterior
Acetosolv	Ácido acético	Ácido mineral (HCl)	-
Acetocell	Ácido acético	Sin catalizador	-
Acetoline	Ácido acético	-	Ácido mineral
Formacell	Ácido fórmico	Ácido acético	-
Formiline	Ácido fórmico	-	Alcalino (NaOH o Ca(OH) ₂)
Formosolv	Ácido fórmico	Ácido mineral (HCl)	-
Milox	Ácido fórmico	H ₂ O ₂	-

- **Otros solventes:** acetona, tetrahidrofurano o dimetilformamida también son usados como disolventes en procesos organosolv.

3.7.1. Reacciones de deslignificación

Los tratamientos organosolv consisten en procesos de deslignificación de materiales lignocelulósicos que implican la rotura de los enlaces éter de la lignina, la disolución de la lignina y la generación de ligninas de bajo peso molecular y fenoles (Zhang y col., 2016b).

En los procesos autocatalíticos, el tratamiento empieza con la reacción de autoionización del agua que genera iones hidronio. Estos iones producen la rotura de los grupos acetilo de la hemicelulosa que se liberan a la fase líquida en forma de ácido acético. Los iones hidronio, procedentes del agua y del ácido acético, son los responsables de la rotura hidrolítica de los enlaces α y β -aril éter de la lignina, siendo la rotura del enlace α -aril éter la predominante (Zhang y col., 2016b).

Cuando se genera el medio ácido por la liberación de ácidos orgánicos, como el ácido acético, tiene lugar la formación del carbocatión bencílico en la lignina. Éste se produce mediante la rotura del enlace α -aril éter tras la protonación del carbono $C\alpha$ (Figura 3.6). El carbocatión se considera un compuesto intermedio en las reacciones de despolimerización y de recondensación de la lignina.

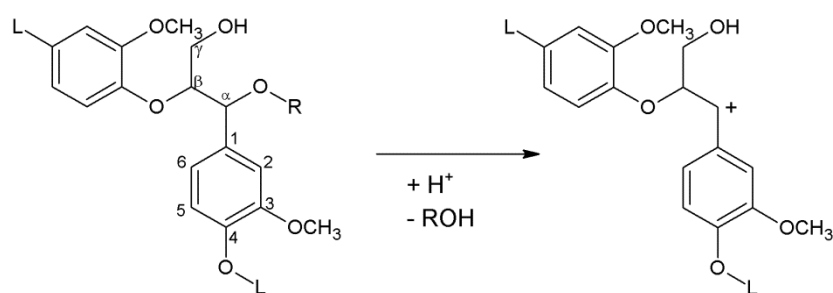


Figura 3.6. Formación del carbocatión bencílico por la rotura del enlace α -aril éter.

La rotura del enlace β -aril éter se produce tras la formación del carbocatión bencílico. Se han propuesto dos mecanismos que implican la formación de un éter enólico a partir de dicho carbocatión (McDonough, 1992). Estos mecanismos se pueden dar por la eliminación de un protón (Figura 3.7a) o por la eliminación del grupo hidroximetilo situado en la posición γ que da lugar a la liberación de formaldehído (Figura 3.7b).

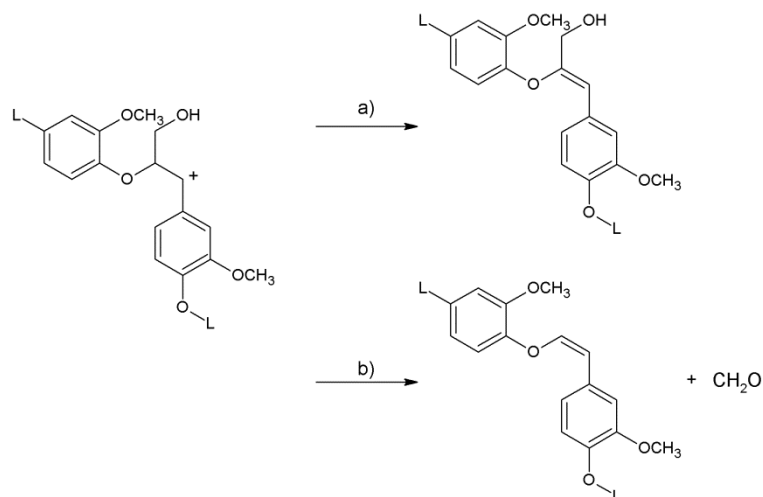


Figura 3.7. Formación del éter enólico a partir del carbocatión bencílico: a) Eliminación del protón y b) Eliminación del grupo hidrometoxilo.

Cuando el carbocatión bencílico pierde un protón y se genera el éter enólico (Figura 3.7a), éste se hidroliza rompiendo el enlace β -O-4 y da lugar a la formación de un grupo cetónico en la posición β (Figura 3.8).

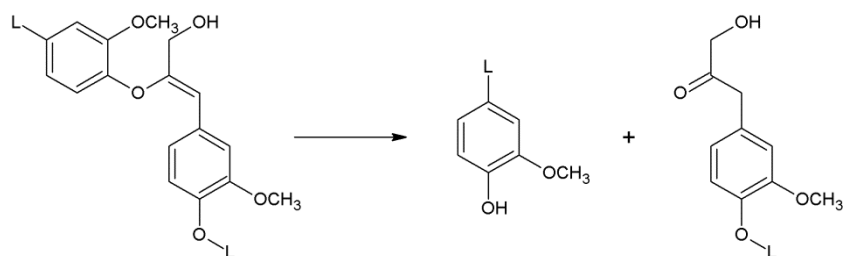


Figura 3.8. Rotura del enlace β -O-4 con la formación de cetona en posición β .

Este grupo cetónico se encuentra en equilibrio con un grupo de compuestos también conocido como cetonas de Hibbert (Figura 3.9).

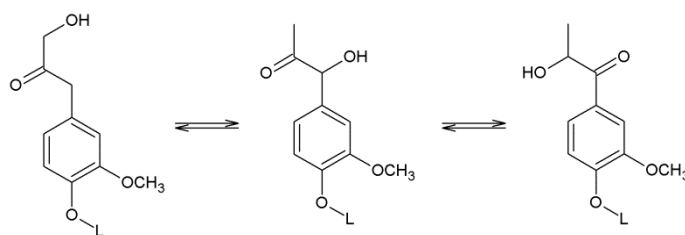


Figura 3.9. Cetonas de Hibbert.

Otra posible vía de rotura de los enlaces β -O-4 es la formación del estilbeno (Figura 3.10) que se produce tras la formación de una estructura intermedia que presenta un enlace β -1 (Hallac y col, 2010b).

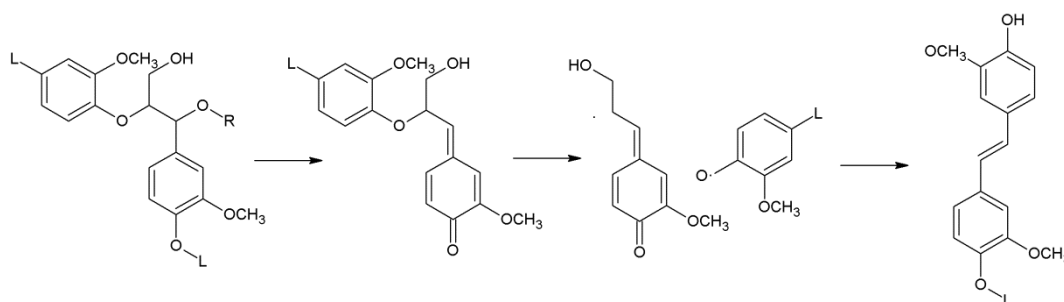


Figura 3.10. Rotura del enlace β -O-4 con la formación del estilbeno.

Como se ha comentado anteriormente, el carbocatión bencílico también forma parte de las reacciones de condensación de la lignina. En ellas, el carbono $C\alpha$ de la cadena alquílica de la lignina se enlaza con un carbono rico en electrones del anillo aromático de otra unidad de lignina (Figura 3.11). Esta reacción nucleófila se produce con los carbonos de las posiciones libres, C_5 y C_6 , del anillo aromático (Li y col., 2007; Hallac y col., 2010b).

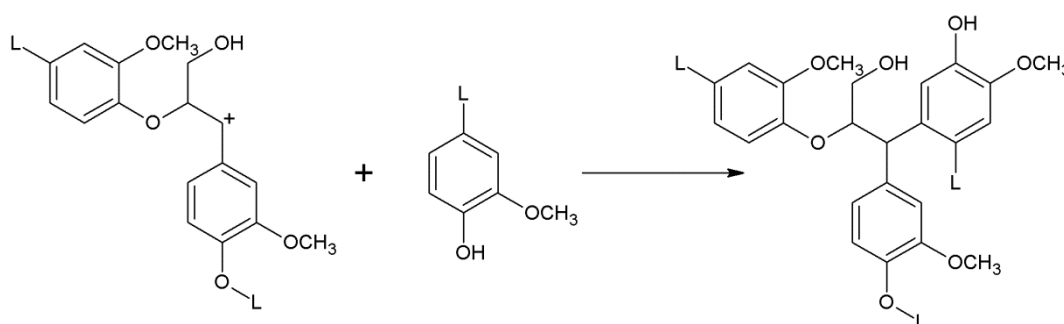


Figura 3.11. Reacción de repolimerización por adición nucleófila.

Estos enlaces carbono-carbono dan lugar a estructuras de lignina repolimerizadas que son más estables y más difíciles de romper (Pielhop y col., 2015).

3.7.2. Procesos organosolv como pretratamiento a escala planta piloto

Los pretratamientos de biomasa que usan disolventes orgánicos no están todavía a nivel comercial. Sin embargo, diferentes compañías han llevado o están llevando a cabo estudios en planta piloto que demuestran el gran potencial que presenta. Algunas de ellas se recogen en la Tabla 3.3 (Zhang y col., 2016a).

Tabla 3.3. Plantas piloto de procesos organosolv.

Materias primas	Localización	Disolvente	Nombre del proyecto/Compañía
Maderas duras, blandas y residuos agrícolas	Canadá	Etanol	Alcell (Lignol Innovations)
Residuos forestales, residuos agrícolas y cultivos energéticos	EEUU	Butanol y otros solventes orgánicos	AST (American Science and Technology)
Paja, caña, bagazo, tallos de maíz y residuos de madera	Finlandia	Ácido fórmico	Chempolis
Residuos agrícolas, maderas duras	Francia	Ácido acético y fórmico	CIMV
Residuos agrícolas, pajas y maderas	Holanda	Etanol	ECN
Madera dura	Alemania	Etanol	Fraunhofer CBP
Residuos agrícolas	Australia	Glicerol	Glycell
Madera	Alemania	Metanol	Organocell

A continuación, se detallan algunos de estos procesos, mostrando sus esquemas y las condiciones de trabajo en las que operan.

3.7.2.1. Proceso CIMV

El proceso CIMV se desarrolla en una planta piloto ubicada en Francia, cuyo esquema simplificado se recoge en la Figura 3.12. Consiste en un proceso en continuo donde trabajan con diferentes materias primas como residuos agrícolas o maderas duras, con un caudal másico de 40 kg/h. El fraccionamiento se lleva a cabo mediante un tratamiento organosolv usando ácido acético y fórmico como disolventes, lo que permite operar a presiones atmosféricas y a bajas temperaturas (105 °C). Se consigue una fracción rica en hemicelulosas que representa el 23 % de la materia prima inicial, una lignina de alta pureza (91 %) y una pasta de celulosa con alta digestibilidad enzimática.

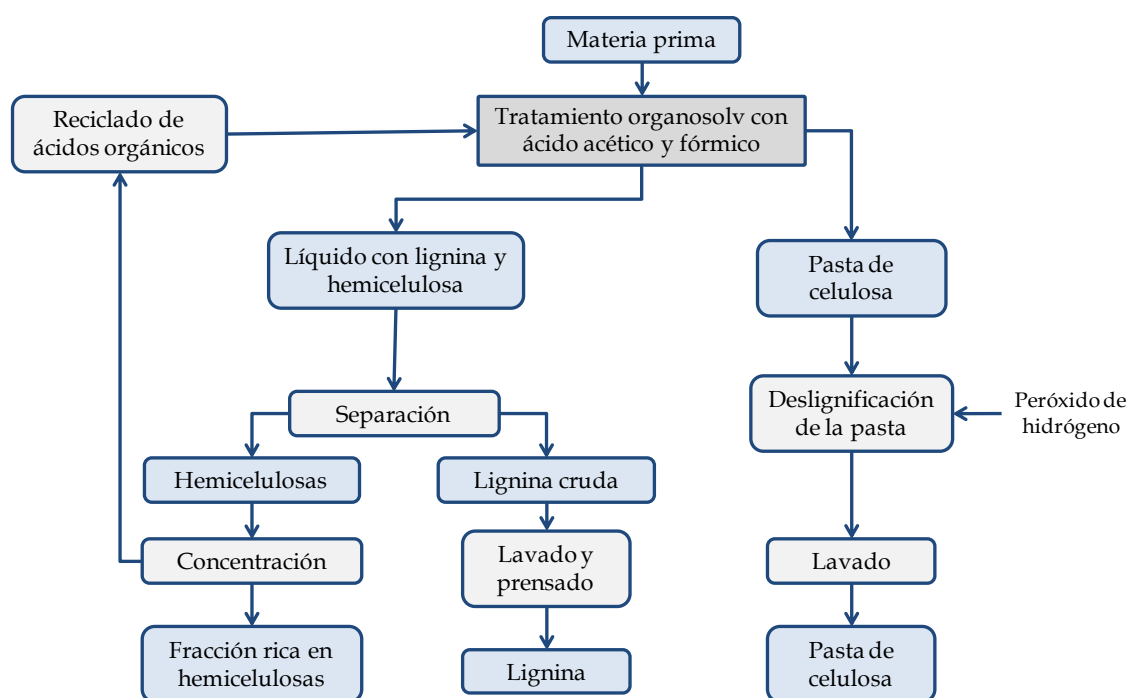


Figura 3.12. Esquema del proceso CIMV (Adaptado de Snelders y col., 2014a).

A partir de las fracciones obtenidas se busca producir compuestos como etanol, ácido itacónico, resinas fenólicas o xilitol, entre otras. Destacar la introducción de peróxido de hidrógeno para llevar a cabo la purificación de la celulosa obtenida (Snelders y col., 2014a; Snelders y col., 2014b; de Wild y col., 2015).

3.7.2.2. Proceso ECN

El proceso ECN se desarrolla en una planta piloto que opera en discontinuo con una capacidad de procesamiento de 1,5 kg en un reactor de 20 L. Las materias primas empleadas son residuos agrícolas, pajas y maderas tanto duras como blandas. El disolvente aplicado es una mezcla etanol/agua (60 % en peso) y la temperatura de operación es de 190 °C. De forma paralela al proceso de CIMV, obtiene tres fracciones a partir de la biomasa; la fracción de hemicelulosas que se encuentra degradada a furfural, la lignina de alta pureza (95 %) y una pasta de celulosa que es hidrolizable vía enzimática (Wildschut y col., 2013; Snelders y col., 2014a; Snelders y col., 2014b).

3.7.2.3. Fraunhofer CBP

La planta piloto de Fraunhofer CBP (Leuna, Alemania) se basa en el tratamiento organosolv de una madera dura (haya, *Fagus Sylvatica*), usando una mezcla de etanol/agua como disolvente. Las astillas se tratan en un digestor de 400 L a 170 °C durante 100 min y un 0,5 % de ácido sulfúrico como catalizador, partiendo de una cantidad de 70 Kg. A partir de los resultados obtenidos en planta piloto, se ha llevado a cabo la simulación de la planta que se recoge en la Figura 3.13, presentando una capacidad de 50 t/h de madera en base seca. Sus productos principales son la lignina recuperada tras la disolución en la lejía negra, la glucosa procedente de la hidrólisis enzimática de la pasta y la corriente de azúcares de 5 carbonos (Laure y col., 2014).

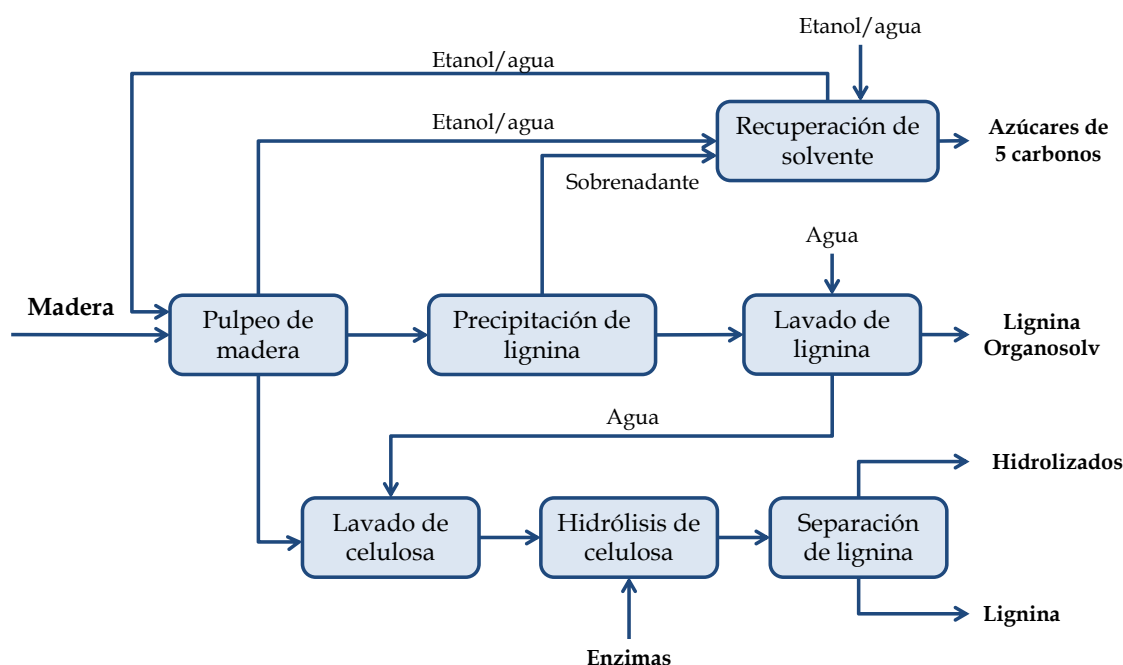


Figura 3.13. Esquema de la planta (Adaptado de Laure y col., 2014).

En este proceso se recupera lignina en dos corrientes: la primera de ellas se obtiene mediante precipitación a partir de la disuelta en la lejía negra, cuya recuperación alcanza el 90 % y la residual tras someter a la pasta a la etapa de hidrólisis. En cuanto a las corrientes de los azúcares, los hidrolizados se componen principalmente de la glucosa procedente de la hidrólisis enzimática de la pasta, cuyo rendimiento de conversión es del 86 % y de la corriente que contiene los azúcares de 5 carbonos (pentosas, oligopentosas) obtenida en la recuperación de los disolventes (Laure y col., 2014).

3.7.3. Aplicaciones de la lignina organosolv

Actualmente, la mayor parte de la lignina residual se quema para producir calor y electricidad y el remanente se considera como material de bajo valor. Sólo un 1 % se comercializa para aplicarlos en bio-químicos y bio-materiales (Mahmood y col., 2016). Las ligninas organosolv, a diferencia de las ligninas Kraft que contienen impurezas como cenizas y sales, tienen una alta pureza, están libres de sulfuro y poseen bajo contenido en carbohidratos y cenizas (Oroumei y col., 2015). Por este motivo, ofrecen la posibilidad de ser convertidas en productos de valor añadido, resultando esta cuestión esencial dentro del concepto de biorrefinería integrada (Gordobil y col., 2016).

Las aplicaciones de la lignina residual del proceso organosolv que se están desarrollando son muy variadas. A continuación se detallan algunas de ellas.

3.7.3.1. Formulación de espumas de poliuretano y resinas fenólicas

Las ligninas organosolv se han introducido en la formulación de espumas de poliuretano como refuerzo para sustituir a los polioles derivados del petróleo, dada la reactividad que le confieren la gran cantidad de los grupos hidróxilo (fenoles y alifáticos) y grupos carboxilo que presenta en su estructura (Li y Ragauskas, 2012). Pan y Saddler (2013) reemplazaron los polioles en la formación de espuma rígida de poliuretano por lignina organosolv de madera dura y por lignina del proceso Kraft. Al analizar las propiedades de la espuma, estos autores concluyeron que la lignina organosolv ofrecía mejores resultados, ya que tenía mejor miscibilidad con los polioles.

La lignina procedente del proceso CIMV, basado en el tratamiento organosolv con ácidos orgánicos, se ha probado como sustituto del fenol en la formulación de las resinas fenol-formaldehído tipo resol (Tachon y col., 2016). También se ha estudiado con la lignina resultante del proceso organosolv que emplea la mezcla etanol/agua como disolvente (Wang y col., 2009; Cheng y col., 2013). El uso de lignina de otras procedencias en la formulación de resinas fenol-formaldehído había sido estudiado con anterioridad. Sin embargo, sin la modificación previa de la misma, los resultados eran poco satisfactorios. Con tratamientos como la hidroximetilación, los lignosulfonatos llegaban a ser más reactivos y las propiedades físico-químicas y de curado de las

resinas mejoraban (Alonso y col., 2005). Tachon y col. (2016) estudiaron la lignina organosolv como fuente de fenol en la síntesis de las resinas fenólicas. Consiguieron sintetizar una resina lignina-fenol-formaldehído, en la cual el 70% del fenol fue reemplazado por la lignina organosolv, sin modificación previa. Estas resinas alcanzaron propiedades físico-químicas similares a las resinas estándar y los requerimientos para ser usados como adhesivos en la fabricación de paneles de contrachapado, en cuanto a materia seca, pH y viscosidad. Además, comprobaron su utilidad en esta aplicación, confirmando que los paneles que usaban este tipo de resinas alcanzaban las especificaciones para paneles industriales.

3.7.3.2. Relleno en films de ácido poliláctico

Una posible aplicación de las ligninas procedentes del proceso organosolv es su uso como relleno en films de ácido poliláctico (PLA). Este material por sí solo es rígido y quebradizo y presenta una baja capacidad de deformación. Mediante la esterificación de las ligninas organosolv con ácidos grasos se conseguía modificar sus propiedades térmicas como la reducción de su temperatura de transición vítrea. Una vez esterificadas, se incorporaban como relleno en la fabricación de films de ácido poliláctico (PLA), proporcionándole plasticidad, reduciendo la rigidez y mejorando la ductilidad de los materiales así obtenidos (Gordobil y col., 2016).

3.7.3.3. Producción de fibras de carbono

Otra posible salida de las ligninas organosolv es su aplicación como precursores para la producción de fibras de carbono (Baker y Rials, 2013). Para facilitar el proceso de producción, las ligninas se mezclan con otros polímeros, como el óxido de polietileno (PEO) o el poliacrilonitrilo (PAN). Sin embargo, la pureza de este precursor resulta un factor crítico. Tomando como punto de partida la lignina organosolv, en lugar de otras ligninas técnicas como la procedente del proceso Kraft, se consigue una mayor pureza. Oroumei y col. (2015) estudiaron la mezcla de la lignina organosolv de una madera dura, en diferentes proporciones, con el poliacrilonitrilo (PAN). Estas fibras presentaban una temperatura de degradación mayor que la de sus componentes de forma individual y una menor energía de activación en la pirólisis que las fibras de PAN puras. Otros autores usaron ligninas procedentes de otras materias primas como

la paja de trigo, modificando la lignina y transformando sus grupos hidróxilo en ésteres, previo a la mezcla con el PAN (Ding y col., 2016).

3.7.3.4. Agentes antioxidantes y agentes antimicrobianos

Las ligninas organosolv, como otras ligninas técnicas, poseen propiedades antioxidantes debido a que los grupos fenólicos actúan como estabilizadores en reacciones inducidas por el oxígeno y sus especies reactivas, frenando el envejecimiento de materiales compuestos y sistemas biológicos. Las ligninas que tienen mayor actividad antioxidante se caracterizan por tener mayores grupos fenólicos, menores alifáticos, menores pesos moleculares y menor polidispersidad. Varias ligninas obtenidas mediante procesos organosolv han sido sometidas a ensayos de actividad antioxidante y los resultados han sido satisfactorios, demostrando así su potencial para ser aplicado en la industria cosmética (Espinoza-Acosta y col., 2016).

La lignina es la mayor fuente de compuestos antimicrobianos naturales. Se ha demostrado su capacidad antimicrobiana ante levaduras y microorganismos como *E. coli*, *S.cerevisiae*, que pueden ser inhibidos por fragmentos de lignina. Esta capacidad dependerá de factores como el origen de la lignina, el método de extracción o la estructura química. El mecanismo de actuación se basa en la rotura de la membrana celular y, por tanto, de la bacteria por parte de los compuestos fenólicos (Espinoza-Acosta y col., 2016).

3.8. Pretratamientos combinados

Los pretratamientos combinados o pretratamientos secuenciales son aquellos en los que se somete a los materiales lignocelulósicos a dos etapas antes de su hidrólisis enzimática. El objetivo de esta combinación es mejorar la hidrólisis de la celulosa y maximizar la utilización de la lignina y la hemicelulosa (Sun y col., 2016). De esta forma, se consigue aprovechar los beneficios que ofrecen los pretratamientos de manera individual, minimizando sus inconvenientes. Por ejemplo, durante un pretratamiento en el que se deslignifica la biomasa lignocelulósica, también se produce la eliminación y degradación de hemicelulosas, dada la proximidad entre las

hemicelulosas y la lignina. Por tanto, planteando un primer paso de extracción de hemicelulosas, éstas podrán ser fácilmente recuperables y utilizadas (Figura 3.14).

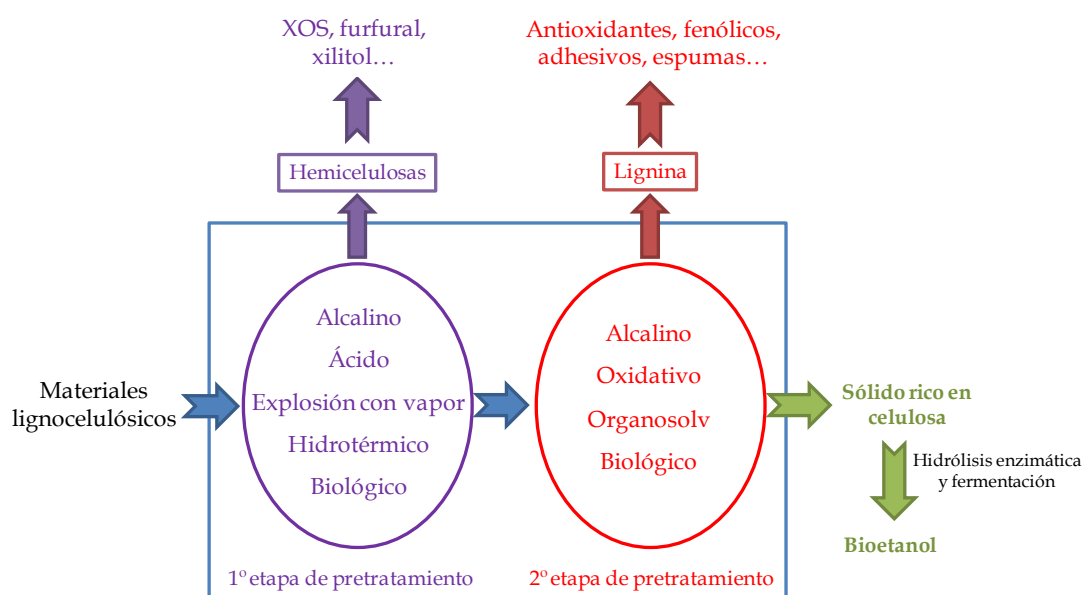


Figura 3.14. Esquema de pretratamientos combinados (Sun y col., 2016).

De forma global, la combinación de pretratamientos se puede plantear como el fraccionamiento y el aprovechamiento de los compuestos de los materiales lignocelulósicos, a la par que sea considerado como un pretratamiento para conseguir incrementar la digestibilidad del sólido rico en celulosa. La glucosa obtenida tendría como salida la obtención de biocombustible mediante la etapa posterior de fermentación, las hemicelulosas de la primera etapa de pretratamiento pueden ser transformadas en productos de valor añadido y la lignina recuperada de la segunda etapa se puede emplear en multitud de aplicaciones como en adhesivos o formulación de espumas. En la Tabla 3.4 se muestran los trabajos más relevantes con la combinación de pretratamientos para materiales lignocelulósicos que han sido realizadas en los últimos diez años, indicando especialmente la combinación seleccionada para este trabajo.

Tabla 3.4. Secuencia de pretratamientos para materiales lignocelulósicos.

Materia prima	Secuencia de pretratamiento	Referencia
Rastrojos de maíz	Ácido + alcalino	Lee y col., 2015
Paja de trigo	Ácido + alcalino / Alcalino+ ácido	Sanchez y col., 2015
Rastrojos de maíz	Ácido + alcalino	Zu y col., 2014
Madera de álamo	Ácido + Organosolv alcalino	Yang y col., 2012
Paja de arroz	Ácido + Explosión con vapor	Chen y col., 2011a
Podas de arboles	Hidrotérmico + alcalino	Cuevas y col., 2014
Madera de eucalipto	Hidrotérmico + alcalino	Sun y col., 2014a
Rastrojos de maíz, paja de trigo y paja de haba de soja	Hidrotérmico + biológico	Wan y Li, 2011
Bambú	Explosión con vapor + alcalino	Sun y col., 2014b
Madera de álamo	Explosión con vapor + organosolv	Panagiotopoulos y col., 2013
Paja de trigo	Explosión con vapor + alcalino	Chen y col., 2008
Madera de olivo	Explosión con vapor + alcalino	Cara y col., 2006
Residuos de palma de aceite	Biológico + ácido	Ishola y Taherzadeh, 2014
Madera de álamo	Biológico + alcalino	Yang y col., 2013
Madera de álamo	Biológico + hidrotérmico	Wang y col., 2012
Madera <i>Eucommia ulmoides</i>	Hidrotérmico + organosolv	Zhu y col., 2015
Paja de arroz	Hidrotérmico + organosolv	Moniz y col., 2015
Paja de trigo	Hidrotérmico + organosolv	Pihlajaniemi y col., 2015; Huijgen y col., 2012; Ruiz y col., 2012
Rastrojo de maíz	Hidrotérmico + organosolv	Buruiana y col., 2014
<i>Miscanthus</i> , residuos de palma de aceite y hierba typha	Hidrotérmico + organosolv	Timilsena y col., 2013
<i>Miscanthus</i>	Hidrotérmico + organosolv	Obama y col., 2012; Brosse y col., 2009
Madera de eucalipto	Hidrotérmico + organosolv	Romaní y col., 2011
Bagazo de caña de azúcar	Hidrotérmico + organosolv	Mesa y col., 2011

A continuación, se describen estas secuencias de tratamientos llevadas a cabo sobre diferentes materiales lignocelulósicos.

3.8.1. Secuencias con pretratamiento ácido

Lee y col. (2015) plantearon un proceso secuencial para los rastrojos de maíz basado en un pretratamiento ácido para extraer las hemicelulosas y un pretratamiento alcalino que eliminara la lignina. Posteriormente, el material tratado se hidrolizaba enzimáticamente. Mediante este proceso consiguieron recuperar entre el 71 y 76 % de la xilosa y entre el 89 y 98 % de la glucosa procedentes de la materia prima. Sanchez y col. (2015) estudiaron el orden de los pretratamientos para determinar qué influencia tenía sobre la recuperación de las fracciones de la paja de trigo. Al evaluar una secuencia ácido + alcalino y otra formada por alcalino + ácido, llegaron a rendimientos similares.

Otras combinaciones aplicadas usando el pretratamiento ácido como paso inicial fueron con organosolv, explosión con vapor y alcalino empleando cal. En todos ellos, se consiguió recuperar las hemicelulosas en la primera etapa; sin embargo, la segunda etapa tenía diversos comportamientos. Al aplicar la explosión con vapor, la estructura de la paja de arroz se destruía, mejorando la hidrólisis enzimática. El pretratamiento con cal producía la eliminación parcial de lignina en los rastrojos de maíz y el organosolv catalizado con alcalino para maderas duras se traducía en recondensación de la lignina (Chen y col., 2011a; Yang y col., 2012; Zu y col., 2014).

3.8.2. Secuencias con autohidrólisis

Uno de los pretratamientos más frecuentes aplicados en las combinaciones es la autohidrólisis, presentada tanto como pretratamiento hidrotérmico o como explosión con vapor. En el caso de los hidrotérmicos (o pretratamiento con agua líquida caliente) es común aplicarlo combinado con pretratamiento alcalino, por ejemplo con biomasa forestal como maderas duras (*Eucalyptus urophylla*) y residuos de almendros (Cuevas y col., 2014; Sun y col., 2014a). Wan y Li (2011) estudiaron el efecto de los pretratamientos hidrotérmicos sobre diferentes materias primas al combinarlos con una etapa biológica usando el hongo *Ceriporiopsis subvermispora*. Los rendimientos de hidrólisis enzimática de la paja de trigo y del haba de soja mejoraban al incluir las etapas de extracción de agua caliente (HWE) a 85 °C y 10 min, y tratamiento acuoso (LHW) a 170 °C y 3 min, respectivamente. Sin embargo, para los rastrojos de maíz, la

inclusión de esta etapa previa al pretratamiento biológico empeora los rendimientos de hidrólisis hacia xilosa y glucosa.

3.8.3. Secuencias con explosión con vapor

La explosión con vapor se suele combinar con etapas de deslignificación, bien a través de pretratamientos alcalinos u organosolv. Sun y col. (2014b) demostraron el efecto sinérgico de la combinación explosión con vapor y deslignificación alcalina en el bambú, alcanzando rendimientos de hidrólisis enzimática cercanos al 71 %, debido a la eliminación de hemicelulosas y lignina, que se traducía en el incremento del área superficial accesible. Esta secuencia también fue estudiada por Panagiotopoulos y col. (2013) sobre madera dura de álamo. La eliminación de lignina en la etapa organosolv se favorecía al someter a la materia prima a una explosión con vapor. De esta forma, recuperaban el 90 % de la hemicelulosa de la madera, eliminaban el 66 % de la lignina inicial y la celulosa remanente en el sólido se hidrolizaba a glucosa con un rendimiento del 88 %. Otros autores estudiaron la combinación de explosión con vapor y deslignificación con peróxido de hidrógeno, específicamente, para madera de olivo y paja de trigo (Cara y col., 2006; Chen y col., 2008). En el caso de la madera de olivo, sumando ambos pretratamiento, llegaron a recuperar la mitad de los azúcares presentes en la biomasa para ser potencialmente convertidos a etanol, alcanzando además una deslignificación del 80 %. En cuanto a la paja de trigo, evaluaron la obtención de bioetanol mediante la sacarificación y fermentación simultánea (SFS) tras las dos etapas de pretratamiento. Las concentraciones de etanol obtenidas fueron de 51,5 g/L, a partir de un sólido rico en celulosa (67 % de pureza), válidas para nivel industrial (Chen y col., 2008).

3.8.4. Secuencias con tratamiento biológico

El pretratamiento biológico tiene como ventajas las bajas demanda de energía y la degradación selectiva de las fracciones de la biomasa. Sin embargo, requiere de largos tiempos de trabajo. La combinación de este pretratamiento con otros podría reducir el tiempo global del proceso. Ishola y Taherzadeh (2014) estudiaron este pretratamiento, usando el hongo *Pleurotus floridanus*, seguido de uno ácido, utilizando ácido fosfórico

para residuos de la industria del aceite de palma. Esta combinación junto con sacarificación y fermentación simultánea (SFS) mejoraba las concentraciones de etanol con respecto a la aplicación de los pretratamientos de forma individual. Además de ácidos, también ha sido probado con pretratamientos alcalinos e hidrotérmicos. El pretratamiento secuencial, basado en el uso del hongo *Trametes velutina* seguido de una deslignificación con etanol (70 % en volumen) y sosa (1 % p/v), fue probado en una madera dura (álamo) y obtuvieron rendimientos próximos al 39 % con la mínima pérdida de biomasa (Yang y col., 2013). La misma materia prima (*Populus tomentosa*) fue sometida al pretratamiento secuencial biológico (*Lenzites betulina*) e hidrotérmico (200 °C y 30 min). Los resultados mostraban que la etapa biológica incrementaba al doble la eliminación de hemicelulosas del sólido (93 %) y 2,66 veces la hidrólisis enzimática con respecto a una única etapa de pretratamiento hidrotérmico, alcanzando rendimientos del 60 % en la sacarificación.

3.8.5. Secuencia autohidrólisis-organosolv

Otra de las combinaciones planteada en bibliografía es el pretratamiento hidrotérmico (autohidrólisis) y organosolv (Romaní y col., 2011; Obama y col., 2012; Moniz y col., 2015). El objetivo de estos trabajos es la recuperación de todos los componentes de la biomasa mediante dos etapas. En la primera etapa de autohidrólisis se pretende la solubilización de las hemicelulosas y en la segunda etapa organosolv se busca la extracción de la mayor cantidad de lignina. Con esta combinación, se trata de obtener un sólido rico en celulosa para ser usado como sustrato en la hidrólisis enzimática. En la primera etapa se intenta maximizar la solubilización de las hemicelulosas en forma de oligosacáridos y monosacáridos, sin llegar a descomponerse en productos de degradación. En la etapa organosolv, se pretende que el sólido tratado presente un alto contenido en celulosa. La recuperación de la lignina solubilizada en esta segunda etapa depende del tipo de materia prima y condiciones empleadas.

Como se muestra en la Tabla 3.4, múltiples materiales lignocelulósicos han sido usados en esta combinación, desde plantas herbáceas (*Miscanthus*), residuos agrícolas (bagazo de caña de azúcar, rastrojos de maíz y pajas de trigo y arroz) hasta materiales más recalcitrantes como maderas (eucalipto y *Eucommia ulmoides*).

En lo referente a las condiciones experimentales, la extracción de hemicelulosas en la primera etapa se lleva a cabo generalmente bajo condiciones de autohidrólisis sin catalizador; en cambio, la segunda etapa de organosolv se realiza con la adición de un ácido mineral (Obama y col., 2012; Timilsena y col., 2013; Zhu y col., 2015) o con una pequeña carga de sosa (Mesa y col., 2011; Ruiz y col., 2012).

Partiendo de plantas herbáceas como materia prima, se consigue una solubilización de 63-73 % de los xilanos presentes en ellos en la primera etapa de autohidrólisis. Esta eliminación de hemicelulosas favorece la etapa organosolv, que llega a alcanzar una deslignificación del 93 % y la posterior hidrólisis enzimática de los sólidos obtenidos, logrando un rendimiento del 98 % (Brosse y col., 2009; Obama y col., 2012). En cuanto a los residuos agrícolas, muestran un comportamiento similar en la primera etapa, ofreciendo buenos rendimientos de recuperación de las hemicelulosas en forma de oligosacáridos y azúcares, encontrándose entre un 44-73 % de la inicial. La cantidad de celulosa que permanece en el sólido tras esta etapa es alta, presentando valores de recuperación próximas al 90 %. En lo referente a la etapa organosolv, la deslignificación de los sólidos obtenidos en la autohidrólisis se encuentra entre 38-41 % (Mesa y col., 2011; Ruiz y col., 2012; Moniz y col., 2015; Pihlajaniemi y col., 2015). Sin embargo, en algún estudio se ha comprobado que al incrementar las condiciones de severidad del tratamiento hidrotérmico, se empeoraba la deslignificación del sólido (Huijgen y col., 2012). En todos los casos, la secuencia de pretratamientos presentaba mejores rendimientos de hidrólisis enzimática con respecto al material de partida, como la paja de arroz, cuyo rendimiento pasaba de 32 % al 68 % o la paja de trigo, desde el 31 % a 64 % (Ruiz y col., 2012; Moniz y col., 2015).

Los estudios de la secuencia autohidrólisis-organosolv sobre madera resaltan el fraccionamiento de los componentes de la misma. Durante la primera etapa se lleva a cabo la extracción de las hemicelulosas en forma de xilooligosacáridos principalmente. A continuación se produce la solubilización de la lignina que puede ser recuperada mediante precipitación. El sólido obtenido tras estas dos etapas es un sólido rico en celulosa (> 70 %) que presenta buena digestibilidad enzimática. En el caso de la madera de eucalipto presenta rendimientos entre 40-61 % y en la madera de *Eucommia ulmoides* alcanza un rendimiento próximo al 90 % (Romaní y col., 2011; Zhu y col., 2015).

4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática de la celulosa consiste en la despolimerización de la misma en sus monómeros constituyentes, es decir, unidades de glucosa. Se lleva a cabo mediante la adición de unas enzimas denominadas celulasas. Cuando se trata de materiales lignocelulósicos, la hidrólisis enzimática está influida por factores relacionados con los sustratos y las enzimas (Chandra y col., 2007; Karimi y Taherzadeh, 2016a; Sun y col., 2016).

4.1. Propiedades físico-químicas del sustrato

Los factores que intervienen en la hidrólisis enzimática relacionados con el sustrato se pueden dividir en dos grandes grupos: propiedades físicas y propiedades químicas. Entre las propiedades físicas del sustrato destacan la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa, junto con la accesibilidad a la misma, determinada por el área superficial interna y externa del sustrato. Dentro de las propiedades

químicas del sustrato que intervienen en la hidrólisis se encuentran la composición del sólido en celulosa, hemicelulosa y lignina y la presencia de productos de degradación que actúan como inhibidores. A continuación, se comentan estas propiedades del sustrato y su influencia en la hidrólisis enzimática.

4.1.1. Cristalinidad

La cristalinidad del sustrato se considera un factor influyente en la hidrólisis enzimática. En algunos estudios se ha relacionado la reducción de la cristalinidad del sólido con la mejora de su digestibilidad (Lee y col., 2009a; Zhao y col., 2009). Es el caso de los materiales sometidos a un pretratamiento con líquidos iónicos, donde la cristalinidad se reduce y se obtiene un sólido amorfo fácilmente hidrolizable. Lee y col. (2009a) encontraron dicha relación entre el índice de cristalinidad y la hidrólisis enzimática de una madera de arce tras ser pretratada con el líquido iónico EmimAc. Otro ejemplo es la celulosa pura Avicel, donde la reducción de cristalinidad, dada por el incremento de las regiones amorfas, se traduce en el incremento de la hidrólisis (Zhao y col., 2009). Sin embargo, en otros trabajos no se ha encontrado dicha relación entre esos parámetros, e incluso, se ha observado el efecto contrario (Lee y col., 2015; Zakaria y col., 2015). En materiales lignocelulósicos, el incremento de la cristalinidad del sustrato, dado por la eliminación de componentes amorfos como las hemicelulosas y la lignina, se traduce en la mejora de la digestibilidad (Xiao y col., 2011; Karimi y Taherzadeh, 2016a). Este aspecto se encuentra muy próximo a la accesibilidad, ya que la extracción de estos polímeros proporciona una mayor área superficial al sustrato.

4.1.2. Accesibilidad

La accesibilidad es considerada como uno de los factores principales en la hidrólisis. El contacto entre la enzima y la celulosa es un requisito para que la hidrólisis enzimática se lleve a cabo, por tanto, el área superficial de la celulosa se convierte así en un factor crítico para el rendimiento de la hidrólisis (Karimi y Taherzadeh, 2016b). Dentro del área superficial, se distingue el área superficial interna determinada por la porosidad de la biomasa y el área superficial externa relacionada con el tamaño de partícula (Meng y Ragauskas, 2014).

Existen diferentes métodos que se pueden emplear para cuantificar estos parámetros y así evaluar la accesibilidad de la enzima a la celulosa. Uno de los métodos para la medida del área superficial es la adsorción de N_2 , en la cual se emplea el modelo Braunauer-Emmett-Teller (BET). Otro de los métodos es el conocido como *Simons'staining*, se trata de un método semicuantitativo para estimar la relación entre poros de pequeño y gran tamaño, mediante la aplicación de dos tintes de distinto color y tamaño molecular que se adsorben en el material pretratado (*Direct Orange* y *Direct Blue*), empleando las ecuaciones de adsorción de Langmuir (Chandra y col., 2008).

A continuación se recogen algunos de los trabajos publicados en los últimos años que relacionan la accesibilidad con la hidrólisis enzimática de la celulosa de materiales lignocelulósicos tras ser pretratados.

Wiman y col. (2012) demostraron la relación entre la accesibilidad y la hidrólisis enzimática de una madera blanda tras ser pretratada mediante explosión con vapor, aplicando los métodos BET y *Simons'staining*. Además, estos autores observaron que el efecto positivo de la accesibilidad dominaba sobre el efecto negativo de la presencia de lignina. Xiao y col. (2013) empleando un tratamiento de autohidrólisis en una madera (*Tamarix ramosissima*), comprobaron la relación entre la accesibilidad a la celulosa y el rendimiento de hidrólisis. En este trabajo la accesibilidad se evaluaba mediante el área superficial BET y el volumen de poro. Goshadrou y col. (2013) estudiaron el efecto de dos tratamientos, con líquido iónico y con ácido, sobre una madera dura (*Populus tremula*). Confirmaron que los sólidos que presentaban mayor adsorción de tintes en el método *Simons'staining*, relacionado con una mayor porosidad y, por tanto, con una mayor accesibilidad a la celulosa, tenían mejores rendimientos de hidrólisis enzimática. Torr y col. (2016) en su evaluación del pretratamiento de una madera de pino con los líquidos iónicos EmimAc y EmimCl concluyeron que el área superficial accesible es la propiedad principal para que se lleve a cabo la hidrólisis enzimática. Meng y col. (2015) estudiaron tres tratamientos sobre la madera de álamo, ácido diluido, hidrotérmico y alcalino, confirmando que el área accesible era un factor importante en la hidrólisis. Estos autores observaron que la accesibilidad a la celulosa predominaba sobre la presencia de lignina en el sólido tratado, especialmente, al emplear condiciones de operación severas de tratamiento ácido.

Rollin y col. (2011) aplicaron dos pretratamientos: la impregnación amoniacal acuosa (SAA) y el pretratamiento COSLIF (basado en secuencia de ácido fosfórico y etanol) sobre hierba. A partir del COSLIF obtuvieron un sólido con una baja deslignificación frente al obtenido por SAA. Sin embargo presentaba mayor accesibilidad y mejores rendimientos de hidrólisis. Por ello, concluyeron que el área superficial accesible a la enzima era más importante que la eliminación de lignina para alcanzar altos rendimientos en la hidrólisis enzimática. Sun y col. (2014a) también confirmaron la relación entre el incremento del área superficial específica y la mejora de la hidrólisis enzimática, empleando como materia prima bambú (*Phyllostachys pubescens*) y un tratamiento secuencial de explosión con vapor y deslignificación alcalina. Brienzo y col. (2017) en el tratamiento de bagazo de caña de azúcar con ácido sulfúrico diluido encontraron una relación lineal entre el rendimiento de hidrólisis con la adsorción de tintes de los materiales tratados (método *Simons'staining*). Esta adsorción total de tintes representa el área interna y externa del sólido tratado, indicando así el área disponible para la acción de la enzima.

La forma más común de incrementar la accesibilidad a la celulosa es el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos, ya sean por métodos físicos, químicos o biológicos. Dichos pretratamientos se encuentran detallados en el capítulo 3 de la presente memoria.

4.1.3. Composición

La composición en celulosa, hemicelulosa y lignina del sustrato a hidrolizar es un aspecto a considerar. La presencia de hemicelulosas y lignina en el sustrato supone una barrera física que impide a las enzimas acceder a la celulosa (Zhao y col., 2012).

La hemicelulosa es el nexo de unión entre la lignina y la celulosa y su eliminación supone el incremento del tamaño de poro, mayor accesibilidad de las enzimas a la celulosa y, por tanto, mayor digestibilidad (Behera y col., 2014). Empleando un pretratamiento como la autohidrólisis, para conseguir la extracción de las hemicelulosas de los materiales lignocelulósicos, se favorece la reacción de hidrólisis enzimática. Se ha aplicado a diversos materiales como madera de bambú y biomasa de palma de aceite, observando que cuando las condiciones de autohidrólisis aplicadas

eran más severas, se incrementaba el rendimiento de la hidrólisis (Li y col., 2014a; Zakaria y col., 2015). En estos estudios, tanto el incremento del área superficial como el del volumen de poro de los materiales pretratados son considerados como los factores claves para mejorar el rendimiento de la hidrólisis, ya que así se facilita la adsorción de la enzima en la celulosa.

En cuanto a la lignina, su contenido y distribución en los materiales lignocelulósicos es uno de los factores limitantes en la hidrólisis enzimática. La inhibición de la enzima por parte de este polímero, además de la actuación de éste como barrera física, puede venir dada por la adsorción no productiva de la enzima a él o por la inhibición de la enzima producida por los productos solubles provenientes de él, es decir, compuestos fenólicos como son la vainillina o el ácido ferúlico (Li y col., 2014b; Saini y col., 2016). Por tanto, la deslignificación del material lignocelulósico supone una mejora en la sacarificación. Kim y Han (2012) encontraron buena concordancia entre la eliminación de lignina y la mejora de la digestibilidad enzimática al pretratar paja de arroz con una disolución alcalina de sosa. Del mismo modo, Perez-Pimienta y col. (2013) pretrataron dos materias primas (bagazo y hierbas) con el líquido iónico EmimAc a fin de mejorar la digestibilidad enzimática. El incremento en el rendimiento de hidrólisis se debió a la deslignificación del sustrato y a la reducción de cristalinidad de la celulosa. En el caso de los pretratamientos organosolv, también se ha observado esta correlación entre la digestibilidad y la deslignificación en materiales como el bagazo de caña de azúcar usando etilenglicol como disolvente (Zhang y col., 2013).

Pihlajaniemi y col. (2016) estudiaron los diferentes factores que afectaban a la hidrólisis enzimática de la paja de trigo sometida a dos pretratamientos: una deslignificación con sosa y una autohidrólisis. Mediante la extracción selectiva de la lignina y las hemicelulosas confirmaron el incremento del tamaño de poro del material, siendo de mayor tamaño en el caso de la extracción de lignina que en el de las hemicelulosas, que daba lugar a poros más pequeños. Estos autores concluyeron que la eliminación de lignina mediante el tratamiento de deslignificación era más favorable para la hidrólisis que la extracción de hemicelulosas, ya que la accesibilidad se encuentra limitada por la presencia de lignina tras la autohidrólisis.

4.1.4. Productos de degradación

Los pretratamientos que implican una mejora en la hidrólisis enzimática, también llevan asociados una generación de productos de degradación derivados de la conversión de compuestos fenólicos de la lignina y los azúcares. Estos compuestos son productos de inhibición para etapas posteriores como la fermentación, entre ellos se encuentran los furanos, los ácidos carboxílicos y los fenoles (Behera y col., 2014):

- Los **furanos** (furfural e hidroximetilfurfural) provienen de la descomposición de las pentosas y hexosas.
- Los **ácidos carboxílicos** (acético, fórmico y levulínico) son comunes en las fases líquidas procedentes de los pretratamientos acuosos. El ácido acético procede de la liberación de los grupos acetilo de las hemicelulosas. Los ácidos fórmico y levulínico son producidos por la deshidratación de los furanos.
- Los **compuestos fenólicos** proceden de la degradación de la lignina durante los pretratamientos, entre los que destacan la vainillina, el siringaldehído y p-hidroxibenzaldehído.

La eliminación de estos compuestos de degradación de manera previa a otras etapas del proceso se realiza mediante la detoxificación (Putro y col., 2016). Esta etapa tiene mayor importancia cuando el modo de operación se basa en sistemas integrados como la hidrólisis y la fermentación simultánea (SFS).

La efectividad del método de detoxificación va a depender del tipo de hemicelulosa hidrolizada y del tipo de microorganismo implicado en el proceso, ya que tienen diferente grado de tolerancia a los inhibidores. Existen diferentes métodos de detoxificación, como el uso de membranas, las resinas de intercambio iónico, la neutralización con sosa o el empleo de enzimas como lacasas y peroxidasas (Moreno y col., 2015; Putro y col., 2016).

En la actualidad, también se están planteando diferentes estrategias para minimizar la generación de los productos de degradación, como es la selección de la materia prima y el esquema de proceso más adecuados, o incluso, la modificación genética de los microorganismos para incrementar su tolerancia a estos productos de inhibición (Jönsson y Martín, 2016).

4.2. Celulasas

La hidrólisis enzimática de la celulosa se realiza mediante la adición de enzimas, denominadas celulasas, que proceden de hongos aerobios. Estas enzimas pertenecen a la familia de las glicosil hidrolasas y catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico, como se esquematiza en la Figura 4.1. Generalmente, se producen a partir de microorganismos tales como *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum* o *Aspergillus niger* (Gutiérrez-Rojas y col., 2015).

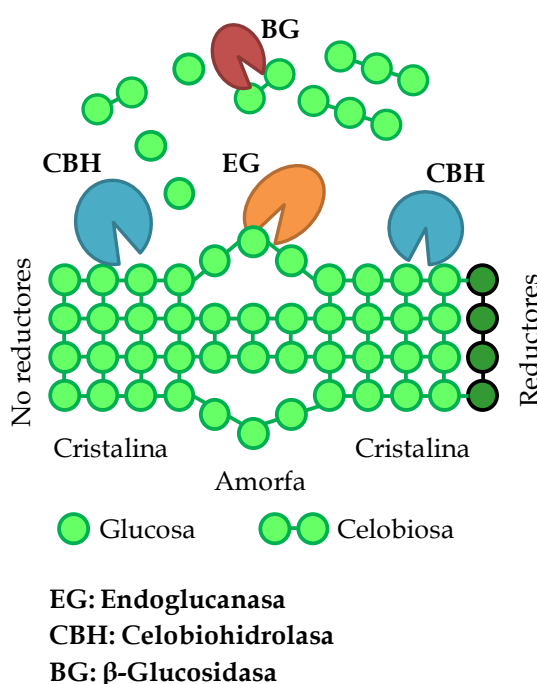


Figura 4.1. Esquema simplificado de la hidrólisis enzimática de la celulosa
(Adaptado de Ratanakhanokchai y col., 2013).

Las celulasas se componen de tres clases funcionales: endoglucanasas, exoglucanasas y β-glucosidasas. A continuación, se detalla la actuación de cada una de ellas en la hidrólisis enzimática (Van Dyk y Pletschke, 2012; Gutiérrez-Rojas y col., 2015; Zhang y col., 2016b):

- Las endoglucanasas (EG, endo-1,4-β-D-glucanasas) actúan de manera aleatoria en el interior de las regiones amorfas de la celulosa, rompiendo los enlaces β-1,4-glucosídicos y generando oligosacáridos de diferentes grados de polimerización. Dan lugar a cadenas con extremos libres más accesibles para la actuación de las celobiohidrolasas.

-
- Las exoglucanasas incluyen las celobiohidrolasas y las glucanohidrolasas. Las celobiohidrolasas (CBH, 1,4- β -D-celobiohidrolasas) son aquellas que actúan sobre los extremos de las cadenas, liberando al medio celobiosas (2 unidades de glucosa). Existen dos tipos: CBH I, atacan a los extremos reductores y CBH II que lo hacen sobre no reductores. Las glucanohidrolasas (1,4- β -D-glucohidrolasa) son aquellas que actúan sobre los extremos no reductores, liberando unidades de glucosa.
 - Las β -glucosidasas (BG, glucohidrolasas) rompen el enlace β de las moléculas de celobiosas para obtener los monómeros de glucosa.

La actividad de las celulasas está condicionada por la temperatura y el pH. La temperatura es el factor más importante y su valor óptimo se encuentra en el intervalo 40-60 °C, usando frecuentemente 50 °C. El valor óptimo de pH se encuentra, normalmente, entre 4,5 y 5,5 (Mesa y col., 2010; Li y col., 2014a; Torr y col., 2016).

La mayoría de las celulasas tienen una estructura modular compuesta de un dominio catalítico y un módulo de unión a los carbohidratos (CBM, *carbohydrate-binding module*) que se encuentran unidos mediante una región conectora. El módulo CBM tiene un papel fundamental en el enlace de las enzimas a la celulosa, mientras que el dominio catalítico es el responsable de la reacción de hidrólisis por sí mismo (Gutiérrez-Rojas y col., 2015; Zhang y col., 2016b).

4.2.1. Complejos enzimáticos

Los complejos enzimáticos comerciales, además de contener las celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas), son cócteles que también incluyen otras enzimas como xilanasas, pectinasas, etc. (Van Dyk y Pletschke, 2012; Gutiérrez-Rojas y col., 2015). Estos complejos enzimáticos pueden emplearse en la hidrólisis de materiales lignocelulósicos, siendo los proveedores más comunes Novozymes y Genencor.

Las enzimas más habituales de Novozymes encontradas en bibliografía son las Celluclast 1,5 L utilizadas en combinación con Novozyme 188 (Sannigrahi y col., 2010; Mesa y col., 2011; Timilsena y col., 2013; Buruiana y col., 2014). Sin embargo, cada vez

es más frecuente el uso del complejo Cellic CTec2 (Ertas y col., 2014; Chen y col., 2015; Gonçalves y col., 2015; Michelin y Texeira, 2016; Cybulska y col., 2017). Con respecto a las enzimas de Genencor, el cóctel enzimático Spezyme CP ha sido empleado para la hidrólisis de materiales previamente tratados (Del Rio y col., 2010; Panagiotopoulos y col., 2013). Uno de los complejos más usados de esta casa comercial, en los estudios de tratamientos de la biomasa lignocelulósica, es Accellerase 1500 (Huijgen y col., 2012; Govumoni y col., 2013; Hiden y col., 2013; Li y col., 2014b; Sun y col., 2015; Pielhop y col., 2016b; Bhagia y col., 2017).

4.2.2. Adsorción y desorción de la enzima

La hidrólisis enzimática de la celulosa se produce en tres etapas: una primera donde la enzima se adsorbe a la superficie de la celulosa, una segunda en la que se produce la hidrólisis de la celulosa y una tercera en la que se lleva a cabo la desorción de las enzimas adsorbidas a la fase líquida. En base a este mecanismo de hidrólisis, el factor clave es la interacción entre la enzima y el sustrato, es decir, la adsorción y desorción de la celulasa. La conversión de la celulosa a glucosa comienza con la adsorción de la enzima sobre las moléculas de celulosa. Tras llevar a cabo la hidrólisis en ese segmento, la celulasa debe desorberse para comenzar a hidrolizar un nuevo segmento. En ocasiones, se producen adsorciones denominadas “no específicas” que producen limitaciones en la hidrólisis; por ejemplo, cuando la celulasa se adsorbe a la lignina en lugar de a la celulosa, dejando así menos enzimas disponibles para la hidrólisis. La adsorción y desorción está influida por las propiedades del sustrato comentadas en el epígrafe 4.1, tales como la cristalinidad, el área superficial disponible, el tamaño de partícula o el contenido en lignina y celulosa (Karimi y Taherzadeh, 2016b).

4.3. Factores que influyen en la hidrólisis enzimática

Además de los factores, tanto químicos como físicos del sustrato, existen otro tipo de factores que influyen en la hidrólisis enzimática relacionados con las cargas, el secado del sustrato o la adición de surfactantes o aditivos. A continuación se detalla cada uno de ellos.

4.3.1. Cargas de enzima y de sustrato

Las cargas, tanto de la enzima como del sustrato, se deben elegir para conseguir la eficacia óptima en la hidrólisis. La **carga de la enzima** depende del tipo de sustrato, de su composición y del tipo de pretratamiento al que haya sido sometido. Los sustratos con alto contenido en lignina en su composición pueden requerir más celulasas debido a los enlaces “no productivos” que se forman con ella (Van Dyk y Pletschke, 2012; Saini y col., 2016). De manera general, el incremento en la carga se traduce en la mejora del rendimiento de la hidrólisis. Sin embargo, si la carga enzimática es muy elevada, se producirá una competición entre las enzimas por los sitios de unión de la celulosa y se reducirá la velocidad de hidrólisis (Van Dyk y Pletschke, 2012).

La carga de la enzima no presenta un único criterio para ser incorporada a la hidrólisis. Se puede añadir en función de la masa de sustrato o de la masa de la celulosa presente en este sustrato (Chen y col., 2014; Pihlajaniemi y col., 2015). Los valores más frecuentes se encuentran entre 15-30 FPU/g_{sustrato} o 40-60 FPU/g_{celulosa}, siendo las unidades de FPU (*filter unit paper*) la medida de actividad de la enzima (Huijgen y col., 2012; Obama y col., 2012; Qin y col., 2013; Chen y col., 2014; Li y col., 2014a; Pihlajaniemi y col., 2015).

Con respecto a la **carga de sustrato**, muchos de los estudios enfocados a la evaluación de los pretratamientos para mejorar la hidrólisis enzimática se llevan a cabo bajo condiciones de carga de sustrato que se encuentran comprendidas entre 1-5 % (peso/volumen) (Huijgen y col., 2012; Timilsena y col., 2013; Ertas y col., 2014; Zhu y col., 2015; Brienzo y col., 2017).

4.3.2. Secado del sustrato

El secado del sustrato, previo a su hidrólisis enzimática, se relaciona con la reducción del rendimiento, debido al colapso de la estructura interna. Durante la eliminación de agua, se forman nuevos enlaces entre las microfibrillas adyacentes de celulosa, produciendo que los poros internos se colapsen. Como consecuencia, el área interna se reduce, así como la porosidad del sustrato y la accesibilidad de las enzimas (Van Dyk y Pletschke, 2012).

Luo y Zhu (2011) estudiaron el efecto de diferentes condiciones de secado sobre sustratos lignocelulósicos previo a su hidrólisis enzimática. Estos autores confirmaron la relación existente entre la disminución de digestibilidad enzimática y la reducción de la accesibilidad, producida durante el secado de los sólidos tratados.

4.3.3. Surfactantes y aditivos

La adición de surfactantes no iónicos como Tween 20, Tween 80 y Triton u otros aditivos como proteínas no catalíticas como la seroalbúmina bovina (BSA) y polímeros como el polietilenglicol (PEG) suponen una mejora en la conversión de la celulosa a glucosa (Rollin y col., 2011; Li y col., 2014b; Ko y col., 2015; Wang y col., 2015b; Noori y Karimi, 2016; Cebreiros y col., 2017). Estos surfactantes previenen los enlaces no productivos de la enzima con la lignina, ya que se produce la interacción hidrofóbica con la lignina y libera las enzimas adsorbidas en ellas (Van Dyk y Pletschke, 2012).

Eriksson y col. (2002) estudiaron la adición de diferentes surfactantes durante la hidrólisis de píceas pretratadas con explosión de vapor, a fin de incrementar la digestibilidad e intentar reducir la carga de enzima. Entre ellos destacaba el Tween 20, que es el surfactante más frecuente para mejorar la hidrólisis enzimática de materiales pretratados (Mesa y col., 2010; Liu y col., 2014; Noori y Karimi, 2016). La adición de la seroalbúmina bovina (BSA) a un material sometido a un tratamiento con sosa fue estudiada por Wang y col. (2015b). Confirmaron la mejora de la digestibilidad enzimática, entre 13-19 %, dependiendo de la carga de enzima añadida. Además del BSA, probaron otras proteínas como peptinas y extractos de levaduras, con mejoras similares en la hidrólisis.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En este capítulo se describe el planteamiento experimental y la metodología de diseño de experimentos y análisis estadístico utilizada en esta tesis. A continuación, se indican los materiales y reactivos empleados y se detallan los diferentes tratamientos realizados sobre la madera de pino para conseguir su fraccionamiento, así como las técnicas de caracterización de las diferentes fases obtenidas en los ensayos. Finalmente, se explica la experimentación realizada para el estudio de la hidrólisis enzimática de las muestras obtenidas con sus correspondientes análisis.

5.1. Planteamiento experimental

El planteamiento experimental seguido en esta Tesis Doctoral se encuentra dividido en tres grandes bloques como se esquematiza en la Figura 5.1. El primer bloque se centra en el estudio de la extracción selectiva de las hemicelulosas de la madera de pino mediante un tratamiento de autohidrólisis (AH) en el cual se usa agua a alta temperatura como disolvente. Se analiza la influencia de la temperatura y el tiempo del tratamiento sobre el sólido resultante (madera autohidrolizada) y sobre la fase líquida rica en hemicelulosas. Se determina el contenido de carbohidratos y lignina en la madera autohidrolizada, así como sus grupos funcionales y su estabilidad térmica. A su vez, se realiza la cuantificación de los oligosacáridos, los monosacáridos y los productos de degradación presentes en la fase líquida. Se pretende obtener una corriente rica en hemicelulosas con el menor contenido en productos de degradación.

El segundo bloque estudia la deslignificación de la madera de pino mediante un proceso organosolv autocatalítico (ORG) usando como disolvente una mezcla etanol/agua. Se estudia la influencia de la temperatura, el tiempo y el porcentaje de etanol del proceso organosolv sobre el sólido deslignificado y sobre la lignina organosolv recuperada de la lejía. El sólido deslignificado se caracteriza para determinar el contenido en carbohidratos y lignina, sus grupos funcionales y su estabilidad térmica. La lignina organosolv se caracteriza para conocer su distribución de pesos moleculares y su estabilidad térmica. Se pretende obtener un sólido deslignificado rico en celulosa y, además, una alta recuperación de la lignina extraída de la lejía negra.

En el tercer bloque se plantea un tratamiento secuencial autohidrólisis-organosolv (AH-ORG), en el cual, tras la recuperación selectiva de hemicelulosas y lignina, se evalúa la conversión de la celulosa del sólido resultante a glucosa mediante una etapa posterior de hidrólisis enzimática (HE). Este bloque se encuentra subdividido en dos apartados atendiendo a las condiciones aplicadas en la etapa organosolv: operando de forma autocatalítica o incorporando un catalizador ácido. En ambos casos, la hidrólisis enzimática realizada sobre el sólido deslignificado obtenido en el proceso secuencial (AH-ORG₂₀₀ o AH-ORG_{A,185}) se compara con la realizada sobre el sólido obtenido en el

proceso organosolv autocatalítico (ORG₂₀₀) y en el proceso organosolv ácido (ORG_{A,185}), llevados a cabo sin autohidrólisis previa.

En el tratamiento organosolv autocatalítico se estudia la influencia de la autohidrólisis previa sobre la deslignificación de la madera de pino y la posterior hidrólisis enzimática, aplicando diferentes condiciones de severidad en la extracción de hemicelulosas y manteniendo el proceso organosolv bajo las mismas condiciones autocatalíticas. A fin de evaluar las secuencias planteadas, se caracterizan los sólidos deslignificados obtenidos (ORG₂₀₀ y AH-ORG₂₀₀) para determinar su contenido en carbohidratos y lignina, sus grupos funcionales y su estabilidad térmica. Además, estos sólidos deslignificados se utilizan como sustrato en la hidrólisis enzimática para cuantificar la conversión de la celulosa presente en ellos a glucosa. En cuanto a la lignina organosolv recuperada en los diferentes ensayos, se analiza para determinar su distribución de pesos moleculares y su estabilidad térmica.

En el organosolv ácido, además de la incorporación de la autohidrólisis, se estudia la influencia de la adición de un catalizador ácido a la etapa organosolv sobre la deslignificación e hidrólisis enzimática. Todas las fases obtenidas en las condiciones ácidas (ORG_{A,185} y AH-ORG_{A,185}) se caracterizan del mismo modo que en el proceso secuencial autocatalítico.

En este tercer bloque se buscan las condiciones de operación más favorables para obtener un alto rendimiento de glucosa tras la hidrólisis enzimática, junto con la máxima recuperación de hemicelulosas y lignina de las primeras etapas de tratamiento para que puedan ser aprovechadas dentro del marco de la biorrefinería.

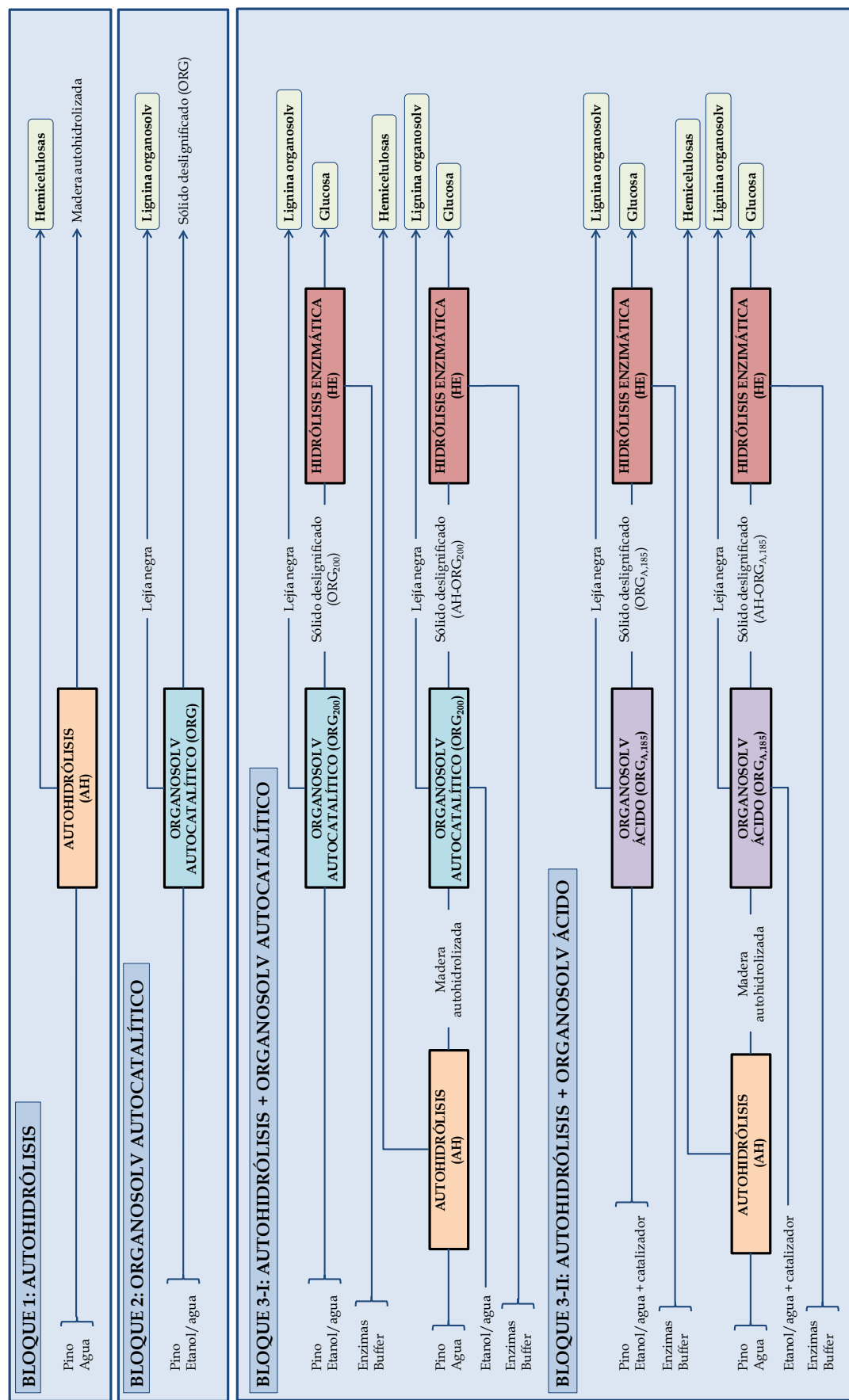


Figura 5.1. Esquema del planteamiento experimental.

5.2. Diseño de experimentos y análisis estadístico

El diseño y análisis estadístico de experimentos es una metodología empleada para evaluar el efecto conjunto de las variables sobre una o varias respuestas del propio sistema. Los diseños de experimentos más eficaces para estudiar dos o más factores son los denominados diseños factoriales. En ellos, se realizan una serie de ensayos, donde se introducen modificaciones en las variables independientes (*factores*) para identificar las causas de los cambios en las variables dependientes (*respuestas*). Para ello, se selecciona un número determinado de niveles (*valores*) para cada una de las variables independientes y se realizan los experimentos con las posibles combinaciones (Box y col., 2011; Montgomery, 2012).

Los diseños que consideran las variaciones a dos niveles (“+1” y “-1”) son los denominados diseños factoriales 2^k , siendo k el número de factores estudiados, y dando lugar a n experimentos ($n = 2^k$). Se trata de diseños que requieren pocos experimentos.

El efecto de un factor es el cambio en la respuesta producido al cambiar el nivel del factor, definiéndose como efecto principal, el referido a los factores de interés (A, B,...K). En ocasiones, existe una interacción entre factores, es decir, el valor de la respuesta cambia para un mismo nivel en función del resto de los niveles de los factores. Estas interacciones se representan con su correspondiente efecto (AB, AC, BC,...K). Si los efectos de los factores no son lineales, es decir, si la respuesta no presenta un modelo lineal, el diseño debe ser ampliado para dar lugar a un diseño compuesto que permita estimar su curvatura. Para ello, se añaden al diseño los puntos centrales, se trata de puntos equidistantes de los niveles inferiores y superiores. A partir de estos puntos se puede estimar la curvatura y el error experimental (error puro). Además, con la agregación al diseño de puntos axiales (o puntos estrellas) se consigue que la función de respuesta considere los efectos en su forma cuadrática. Según los puntos axiales elegidos, el diseño central compuesto puede tener diferentes propiedades como ortogonalidad, rotabilidad y uniformidad. La propiedad de rotabilidad se consigue usando puntos equidistantes del centro del diseño (Jiménez, 2015). La posición del punto axial (α) se establece como indica la ecuación [5.1], teniendo en cuenta el número de factores estudiados (k).

$$\alpha = 2^{\frac{k}{4}} \quad [5.1]$$

Un diseño central compuesto 2^2 consta de un total de 11 experimentos (4 elementales (2^2), 3 puntos centrales y 4 puntos estrellas). Para que sea rotable, la posición de sus puntos axiales viene dada por $\alpha = \pm 1,4142$. La disposición de estos experimentos se muestra en la Figura 5.2.

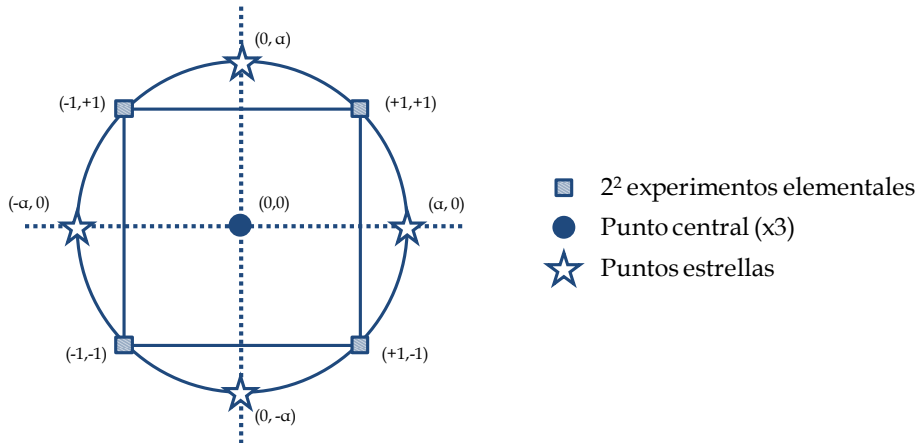


Figura 5.2. Disposición de experimentos en diseño compuesto central 2^2 con tres puntos centrales y cuatro puntos estrellas.

En el caso de un diseño 2^3 , los experimentos totales a realizar son 17, tratándose de 8 elementales (2^3), 3 puntos centrales y 6 puntos estrellas situados con un valor de α de $\pm 1,6818$. De esta forma, se obtiene la disposición de los experimentos que se recoge en la Figura 5.3.

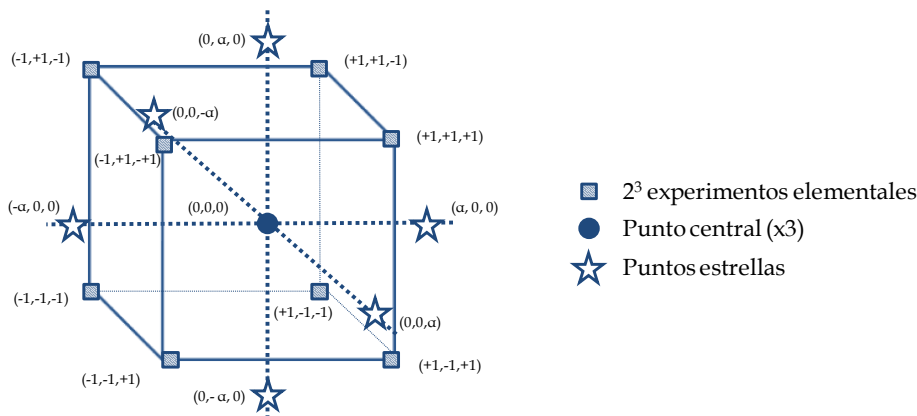


Figura 5.3. Disposición de experimentos en diseño compuesto central 2^3 con tres puntos centrales y seis puntos estrellas.

Una vez obtenidos los resultados experimentales para cada uno de los ensayos se lleva a cabo el tratamiento estadístico de los datos. El análisis estadístico se basa en comparar la varianza de los datos experimentales con la varianza residual, es decir, la varianza producida por el propio error experimental. Si la varianza en los datos es mayor a la residual el resultado no será debido al azar.

El valor de un efecto se calcula a partir de su contraste. Éste se obtiene por combinación lineal de las observaciones según indica la ecuación [5.2].

$$\text{Contraste}_{A B \dots K} = (a \pm 1)(b \pm 1) \dots (k \pm 1) \quad [5.2]$$

donde $a, b \dots k$ son las respuestas obtenidas en los diferentes niveles de las variables independientes. A partir de los contrastes, se pueden estimar los efectos usando la ecuación [5.3].

$$A B \dots K = 2^{1-K} \cdot (\text{Contraste}_{A B \dots K}) \quad [5.3]$$

donde $A, B \dots K$ hacen referencia a los valores de los efectos de las variables independientes y sus interacciones.

Una vez determinados los efectos se debe valorar si éstos son significativos. Para ello, se calcula el valor de la distribución de Fisher (F) para cada efecto y se compara con el valor teórico de F definido por los grados de libertad de cada efecto y los del error puro (error experimental), para un determinado nivel de significación. Si la F calculada es mayor que la F teórica, supondrá que dicho efecto es significativo, ya que la probabilidad de que no se deban al azar es superior al nivel de significación establecido. En este trabajo, se ha considerado un nivel de significación del 95 %, es decir, una probabilidad (P) del 5 % como criterio para determinar si los efectos son significativos o no. Por tanto, por debajo de 0,05, cuanto menor sea el valor de P el efecto será más significativo y mayor será la probabilidad de que el efecto no sea debido al error experimental. El valor de la distribución F para cada efecto se calcula mediante la ecuación [5.4].

$$F = \frac{MC_{\text{efecto}}}{MC_{\text{error}}} \quad [5.4]$$

donde MC_{efecto} y MC_{error} representan la media de cuadrados de cada efecto y el error cuadrático medio, respectivamente. A su vez, dichos parámetros se determinan mediante las ecuaciones [5.5] y [5.6].

$$MC_{\text{efecto}} = \frac{SC_{\text{efecto}}}{g.l._{\text{efecto}}} \quad [5.5]$$

$$MC_{\text{error}} = \frac{SC_{\text{error}}}{g.l._{\text{error}}} \quad [5.6]$$

donde SC_{efecto} y $g.l._{\text{efecto}}$ son la suma de cuadrados y los grados de libertad del efecto, respectivamente. El error cuadrático medio (MC_{error}) estima la varianza del error experimental y se calcula a partir de la suma de cuadrados del error (SC_{error}) y sus grados de libertad ($g.l._{\text{error}}$).

A partir del conjunto de datos experimentales se realiza el ajuste a un modelo polinómico de segundo orden, donde se tienen en cuenta los efectos principales, las interacciones y los términos cuadráticos. Las ecuaciones [5.7] y [5.8] son los modelos que se obtienen al realizar un diseño factorial 2^2 y 2^3 , respectivamente.

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 \quad [5.7]$$

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 \quad [5.8]$$

siendo Y la respuesta estudiada, b_0, b_1, \dots, b_{33} son los coeficientes calculados por regresión múltiple de los datos experimentales empleando el método de mínimos cuadrados y X_1, X_2 y X_3 representan las variables independientes.

La bondad del modelo se comprueba analizando sus residuos y su ajuste mediante el coeficiente de correlación R^2 (ecuación [5.9]).

$$R^2 = \frac{SC_{\text{regresión}}}{SC_{\text{total}}} \quad [5.9]$$

donde $SC_{\text{regresión}}$ es la suma de cuadrados de la diferencia entre los valores predichos por el modelo y la media de los valores observados y SC_{total} es el sumatorio de los cuadrados de las diferencias entre cada una de las observaciones y la media de éstas.

Asimismo, la presentación de los valores observados experimentalmente frente a los predichos por el modelo muestra el ajuste de los datos. De esta forma, cuanto más cercanos estén a la diagonal, el valor de la suma de cuadrados del error es menor y el valor de R^2 está más próximo a 1, denotando un mejor ajuste del modelo a los datos experimentales.

Una vez obtenidos los modelos para las variables estudiadas se representan en tres dimensiones las respuestas predichas por el modelo frente a dos de las variables independientes, manteniendo fijas el resto de variables en el caso de que se estudien tres o más factores (superficies de respuesta). La proyección en dos dimensiones de la superficie de respuesta se conoce como mapa de contorno.

5.3. Fraccionamiento de madera de pino

En este apartado se indican los materiales y reactivos, así como el equipo de reacción que se han utilizado durante la experimentación realizada para fraccionar la madera de pino. A su vez, se detallan los diferentes tratamientos llevados a cabo y las condiciones experimentales usadas en cada uno de ellos.

5.3.1. Materiales y reactivos

La materia prima usada para la realización de esta tesis doctoral es una madera de conífera, *Pinus radiata*, suministrada en forma de astillas tamaño industrial por el Centro de Investigación Forestal perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CIFOR-INIA). Con el objetivo de conseguir un serrín homogéneo para ser empleado como material de partida en todos los tratamientos, se lleva a cabo una molienda de dichas astillas. Este paso se realiza en un molino mecánico de cuchillas de la marca Retsch, insertándole un tamiz de 2 mm de haz de luz. Además, se realiza un tamizado para eliminar los finos menores a 0,30 mm. Esta madera se caracteriza para determinar su contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina siguiendo la norma NREL/TP-510-42618 del Laboratorio Nacional de Energías Renovables, que se describe en el apartado 5.5.2.

Los reactivos empleados para los ensayos experimentales se recogen en la Tabla 5.1, donde se especifica su pureza y la marca que los comercializa.

Tabla 5.1. Reactivos empleados en los ensayos experimentales.

Reactivo	Pureza (%)	Marca
Ácido sulfúrico	72	Fluka
Ácido sulfúrico	98	Panreac Química S.L.U
Agua ^a	-	Panreac Química S.L.U
Agua desionizada ^b	-	Panreac Química S.L.U
Bromuro de litio	≥ 99	Sigma-Aldrich
Bromuro potásico	IR ^c	Panreac Química S.L.U
Carbonato de calcio	98,5-100,5	Panreac Química S.L.U
Dimetilformamida ^a	≥ 99,9	Sigma-Aldrich
Disolución tampón 4,01	-	Crison
Disolución tampón 7,00	-	Crison
Disolución tampón 9,21	-	Crison
Etanol	96 °	Alcoholes Aroca
Hidróxido de sodio (pellets)	98	Panreac Química S.L.U

^a: grado HPLC

^b: grado técnico

^c: pureza de análisis de infrarrojo

5.3.2. Equipo de reacción

El equipo de reacción donde se realizan los tratamientos, autohidrólisis y proceso organosolv, se muestra en la Figura 5.4. Se trata de un reactor a presión modelo 4567 de la marca Parr Instrument Company, Moline, IL. El equipo consta de un controlador de temperatura, presión y velocidad de agitación modelo 4848. Se compone de una vasija de acero inoxidable T316 con 450 mL de capacidad y de una cabeza fija que contiene las principales funciones del reactor:

- Agitación: proporcionada por un agitador de turbina con cuatro palas cuyo accionamiento se realiza de forma magnética. Consta de unos imanes en el rotor interno asociados al eje del agitador y otros imanes en el exterior para evitar el sobrecalentamiento, especialmente, cuando se trabaja con fluidos viscosos.
- Medida de temperatura: se lleva a cabo mediante un termopar tipo J (hierro-constantan), sellado con una vaina de acero inoxidable.
- Medida de presión: se realiza mediante un manómetro y presenta también lectura digital en el controlador.
- Refrigeración: se lleva a cabo con un tubo en U situado en el interior del reactor. La entrada del fluido refrigerante está regulado por una electroválvula conectada al controlador.
- Tubo de inmersión: destinado para la toma de muestras.
- Disco de rotura: medida de seguridad para la liberación de presión cuando se alcance 207 bar.



Figura 5.4. Reactor discontinuo a presión.

A continuación, se detalla el procedimiento seguido cuando se realizan las operaciones en el reactor y que es común a todos los tratamientos. Se comienza con la carga de la vasija con la madera de pino y el correspondiente volumen de disolvente (agua o etanol/agua) para realizar el tratamiento y se une la vasija a la culata de la cabeza fija. Para cerrar el reactor, se sitúan dos mitades de un anillo y se fijan mediante una abrazadera. Una junta tórica de perfluoroelastómero (FFKM), alojada en una ranura de la culata, consigue la estanqueidad total del equipo. La temperatura deseada en la vasija se alcanza mediante la manta calefactora. Para enfriar el reactor se usa como fluido refrigerante aceite de silicona (Sil Oil, M20.195/235.20), bombeado y recirculado mediante un criotermostato de la marca Huber, modelo MPC-K6.

La calefacción y el enfriamiento del reactor se llevan a cabo aplicando un programa de rampas de temperatura y tiempo, que es creado y ejecutado desde el software del controlador. Todos los programas constan de tres etapas, que dan lugar al perfil de temperatura en el reactor tal y como se muestra en la Figura 5.5.

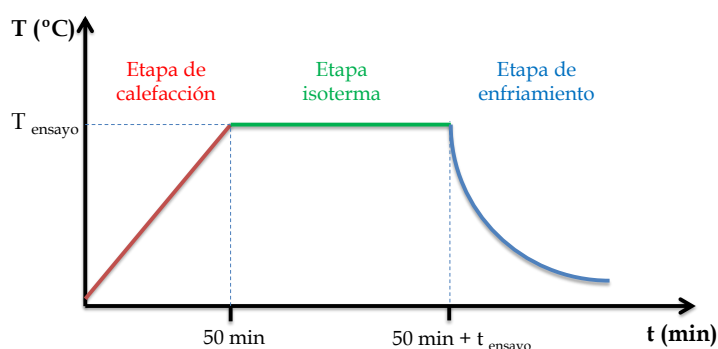


Figura 5.5. Esquema de la rampa de temperatura en reactor.

La primera etapa es la de calentamiento que tiene una duración fija de 50 minutos en todos los experimentos para alcanzar la temperatura de reacción. Después, una segunda etapa isoterma durante el tiempo de reacción correspondiente a cada ensayo y, finalmente, una tercera etapa de refrigeración hasta los 40 °C, momento en el que se descarga el reactor.

5.3.3. Autohidrólisis

El estudio de la extracción de las hemicelulosas de la madera de pino en el tratamiento de autohidrólisis (AH) se lleva a cabo mediante la realización de un diseño de experimentos 2^2 con tres puntos centrales y cuatro puntos estrellas. Se analiza la influencia de las variables independientes, la temperatura y el tiempo, sobre la composición de las dos fases obtenidas durante el tratamiento: la fase sólida y la fase líquida.

En primer lugar se cuantifica la fase sólida obtenida (madera autohidrolizada, ST_{AH}) y se determina su contenido en celulosa (C_{AH}), hemicelulosa, expresado en xilano (X_{AH}), manano (M_{AH}) y galactano (Ga_{AH}), y lignina soluble (LS_{AH}) e insoluble (LI_{AH}). Además, se estudia la estabilidad térmica y el cambio de los grupos funcionales de la madera autohidrolizada obtenida en los diferentes ensayos. En segundo lugar se estudia la composición de la fase líquida, mediante la medida del pH y de la concentración de compuestos presentes en ellas, que se listan a continuación:

- Los oligosacáridos: los arabinooligosacáridos (AO), los glucooligosacáridos (GIO), los galactooligosacáridos (GaO), los mananoligosacáridos (MaO) y los xilooligosacáridos (XO).

- Los monosacáridos: la arabinosa (A), la glucosa (Gl), la galactosa (Ga), la manosa (M) y la xilosa (X).
- Los productos de degradación: el ácido acético (AA), el ácido fórmico (AF), el furfural (F) y el hidroximetilfurfural (HMF).

En la Tabla 5.2 se muestran los intervalos de operación seleccionados para las variables independientes del diseño de autohidrólisis. Las condiciones de temperatura y tiempo se seleccionaron conforme a datos bibliográficos (Lee y col., 2009b; Huijgen y col., 2012; Ferrer y col., 2013).

Tabla 5.2. Variables y niveles de operación en la autohidrólisis.

Variables	Nivel (-)	Nivel (+)
Temperatura (°C)	150	190
Tiempo (min)	30	90

La matriz del diseño de experimentos del tratamiento de autohidrólisis generada con esos intervalos se presenta en la Tabla 5.3. Asimismo se incluye el valor del factor de severidad (S_0) obtenido con la combinación de dichas variables al emplear la ecuación [3.1]. El programa usado para obtener la matriz de experimentos y llevar a cabo el tratamiento estadístico de los resultados es STATGRAPHICS Centurion XVII.

Tabla 5.3. Diseño de experimentos para la autohidrólisis.

Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	S_0
AH-1	170	18	3,31
AH-2	170	60	3,84
AH-3	150	30	2,95
AH-4	150	90	3,43
AH-5	142	60	3,01
AH-6	198	60	4,67
AH-7	170	102	4,07
AH-8	190	90	4,60
AH-9	190	30	4,13
AH-10	170	60	3,84
AH-11	170	60	3,84

El procedimiento de autohidrólisis de la madera de pino se esquematiza en la Figura 5.6. El serrín de madera se trata con agua desionizada en el reactor a presión, con una velocidad de agitación de 200 r.p.m. y usando una relación líquido/sólido de 10/1 (volumen/peso), partiendo de una cantidad inicial de madera de 20 gramos en base seca. Tras el tratamiento, el reactor se descarga y se separan las fases resultantes mediante filtración a vacío con un embudo Büchner y un Kitasato, usando un papel de filtro de la marca Filter-Lab, modelo 1254.

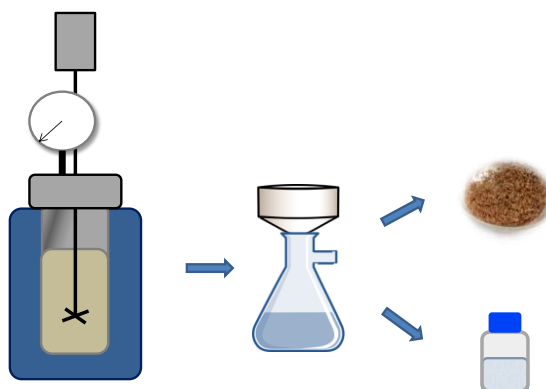


Figura 5.6. Esquema de la autohidrólisis.

La fase sólida o madera autohidrolizada se lava con el doble del volumen usado para el pretratamiento, es decir, con 400 mL de agua desionizada. Posteriormente, se seca en estufa hasta conseguir una humedad menor al 10 % para ser caracterizada por el método marcado en la norma NREL/TP-510-42618 y conocer su composición en carbohidratos y lignina, así como para cuantificar la cantidad de sólido tratado. Este método se encuentra descrito en el apartado 5.5.2 de esta memoria. La fase líquida se analiza mediante HPLC para determinar su concentración de oligosacáridos, monosacáridos y productos de degradación (apartado 5.4.2).

5.3.4. Proceso organosolv

El estudio de la deslignificación de la madera de pino en el proceso organosolv (ORG) se lleva a cabo mediante un diseño de experimentos 2^3 con tres puntos centrales y seis puntos estrellas, en el que se fijan como variables independientes la temperatura, el tiempo y la concentración de disolvente (% en peso de etanol). Se estudia la influencia de estas variables sobre la fase sólida (sólido deslignificado), la lejía negra del proceso y la lignina organosolv recuperada de ésta.

En primer lugar se cuantifica el sólido deslignificado (ST_{ORG}) y se determina su composición, obteniendo el contenido en celulosa (C_{ORG}), hemicelulosa (X_{ORG} , M_{ORG} , Ga_{ORG}) y lignina soluble e insoluble (LS_{ORG} y LI_{ORG}). También, se estudia su estabilidad térmica y los cambios estructurales del sólido deslignificado. En segundo lugar se analiza la lejía negra obtenida, mediante la medida del pH y la cuantificación de los azúcares y los productos de degradación presentes en ella (Gl, X-M-Ga, A, AF, AA, F y HMF). Finalmente, se estudia la lignina organosolv precipitada a partir de la lejía negra, se cuantifica y se analizan sus propiedades. Los niveles superiores e inferiores de operación de las variables independientes, la temperatura, el tiempo y el porcentaje de etanol, se recogen en la Tabla 5.4. Estos intervalos fueron fijados acorde con la bibliografía (Pan y col.; 2006a; Park y col., 2010; Hiden y col., 2013; Wildschut y col., 2013).

Tabla 5.4. Variables y niveles de operación en el proceso organosolv.

Variables	Nivel (-)	Nivel (+)
Etanol (% en peso)	40	60
Temperatura (°C)	170	200
Tiempo (min)	50	100

Los experimentos que se realizan y sus condiciones se presentan en la Tabla 5.5. El programa usado para obtener la matriz de experimentos es STATGRAPHICS Centurion XVII. También se recoge el valor del factor de severidad (S_0) obtenido con la combinación de la temperatura y el tiempo al emplear la ecuación [3.1].

Tabla 5.5. Diseño de experimentos para el proceso organosolv.

Experimento	Etanol (% en peso)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	S ₀
ORG-1	33	185	75	4,38
ORG-2	60	200	50	4,64
ORG-3	50	210	75	5,11
ORG-4	60	170	50	3,76
ORG-5	60	170	100	4,06
ORG-6	50	185	75	4,38
ORG-7	50	185	75	4,38
ORG-8	50	185	33	4,02
ORG-9	50	185	75	4,38
ORG-10	40	200	50	4,64
ORG-11	67	185	75	4,38
ORG-12	50	160	75	3,64
ORG-13	40	200	100	4,94
ORG-14	60	200	100	4,94
ORG-15	40	170	50	3,76
ORG-16	50	185	117	4,57
ORG-17	40	170	100	4,06

Los ensayos del proceso organosolv autocatalítico (Figura 5.7) se realizan partiendo de 20 gramos de serrín de madera de pino en base seca. En este caso, la relación líquido/sólido establecida es de 8/1 (volumen/peso). El disolvente seleccionado para estos tratamientos es una mezcla etanol/agua y la agitación se fija en 200 r.p.m. Tras la descarga del reactor, las fases obtenidas (el sólido deslignificado y la lejía negra) se separan mediante filtración a vacío, usando un embudo Büchner, un Kitasato y un filtro de papel (Filter-Lab, 1254).

La fase sólida (sólido deslignificado) se introduce de nuevo en el reactor junto a una disolución de 160 mL de hidróxido de sodio al 0,4 % (peso/peso) para llevar a cabo una etapa de lavado a temperatura ambiente y 300 r.p.m. durante tres minutos. Tras esta operación, el sólido deslignificado se somete a una segunda etapa de lavado con 2 L de agua sobre un tamiz de 150 μ m. El objetivo de estas dos etapas de lavado es conseguir la máxima eliminación de lignina y de impurezas que puedan quedar en la

superficie del sólido deslignificado. Al igual que con la madera autohidrolizada, este sólido se seca en estufa para su posterior caracterización (apartado 5.5.1 y 5.5.2).

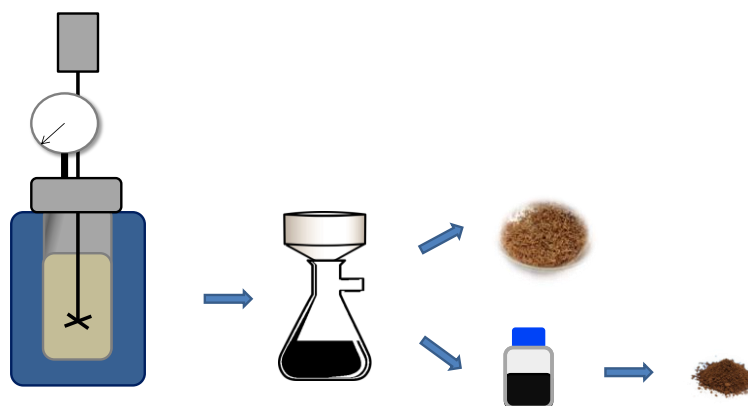


Figura 5.7. Esquema del proceso organosolv.

La lignina organosolv de la lejía negra se precipita mediante acidulación. Para ello, se añade a la lejía negra el mismo volumen de una disolución agua/ácido sulfúrico (0,1 N), que mantiene una proporción 100/2,5 (volumen/volumen). A continuación, se lleva a cabo la evaporación del etanol de la mezcla en un rotavapor de la marca Buchi, modelo R-114, conectado a un controlador de vacío (modelo I-100, de Buchi). La temperatura se fija en 40 °C y la presión en 0,175 bar. Finalmente, la lejía negra acidulada y concentrada se centrifuga a 7.500 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga de la marca Hettich, modelo UNIVERSAL 320. El sólido recuperado (lignina precipitada organosolv) se introduce en la estufa a vacío a 40 °C (marca Raypa). Esta lignina organosolv se caracteriza por diferentes técnicas analíticas, que se describen en el epígrafe 5.6. El líquido sobrenadante se analiza mediante cromatografía de líquidos detallada en el apartado 5.4.

5.3.5. Secuencia de tratamientos autohidrólisis-organosolv

El tercer bloque experimental consiste en el estudio de un proceso secuencial de tratamientos autohidrólisis-organosolv (AH-ORG). El procedimiento seguido se esquematiza en la Figura 5.8. La secuencia comienza con una etapa de autohidrólisis sobre la madera de pino para obtener una corriente líquida con las hemicelulosas y una fase sólida (madera autohidrolizada) que se separan mediante filtración. A continuación, esta madera autohidrolizada se somete a un proceso organosolv para obtener una lejía negra a partir de la cual se precipita la lignina organosolv y un sólido

deslignificado que se utiliza como sustrato en una etapa final de hidrólisis enzimática, como se detalla en el apartado 5.7.

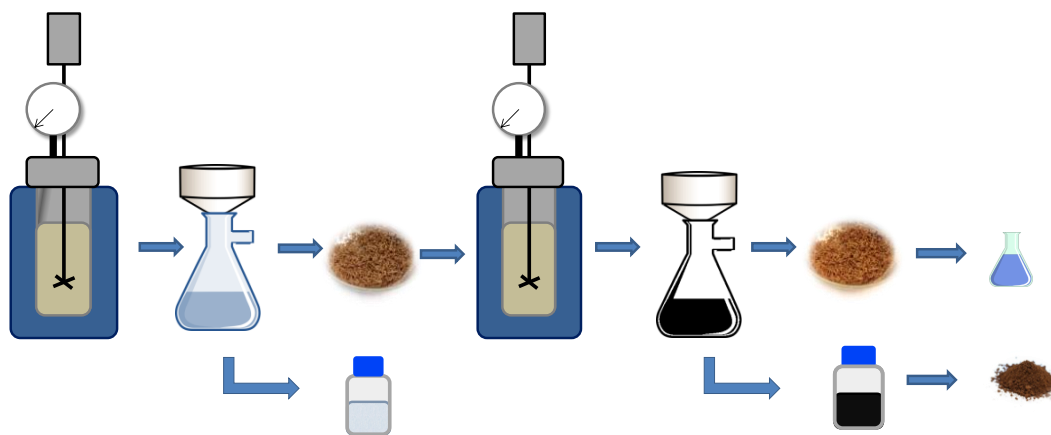


Figura 5.8. Esquema del pretratamiento secuencial autohidrólisis-organosolv.

En primer lugar se cuantifica el sólido deslignificado obtenido tras la secuencia y se determina su contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina. Se analiza su estabilidad térmica y los cambios de los grupos funcionales que presenta. Finalmente, se emplea como sustrato en la hidrólisis enzimática y se calcula el rendimiento de la conversión de la celulosa presente en ellos a glucosa. La lejía negra se analiza determinando su valor del pH y cuantificando los compuestos presentes en ella, los azúcares y los productos de degradación. La lignina organosolv precipitada se cuantifica y se analizan sus propiedades: distribución de pesos moleculares, estabilidad térmica y grupos funcionales. Además, a partir de los resultados de la caracterización de las fases obtenidas, se realiza un análisis de los resultados obtenidos en las secuencias de tratamientos autohidrólisis-organosolv planteadas para evaluarlas y seleccionar la más adecuada para conseguir el fraccionamiento de la madera de partida.

A fin de estudiar la influencia de la etapa de autohidrólisis sobre la deslignificación organosolv se plantean tres condiciones de temperatura y tiempo para la eliminación de hemicelulosas: suaves (AH₁₅₀, 150 °C y 30 min), moderadas (AH₁₇₀, 170 °C y 60 min) y severas (AH₁₉₀, 190 °C y 90 min), manteniendo fijas las condiciones del proceso organosolv. Estas tres condiciones coinciden con los puntos superiores, centrales e inferiores del diseño de experimentos de la autohidrólisis.

Además, se estudia la incorporación de un catalizador a la etapa de deslignificación organosolv. Por ello se emplea una vía autocatalítica y otra ácida

(Figura 5.1). En el proceso organosolv autocatalítico (ORG₂₀₀) se opera a 200 °C, 100 min y con 50 % de etanol, condiciones seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en el diseño de experimentos organosolv. Las condiciones experimentales del organosolv ácido (ORG_{A,185}) se fijan en 185 °C, 75 min, 50 % de etanol y 1 % de ácido sulfúrico, coincidiendo con el punto central del diseño de experimentos organosolv. La cantidad de ácido se añade en proporción 1 % en peso con respecto a la madera autohidrolizada introducida al reactor. Se trata de un valor de concentración próximo al que se emplea frecuentemente en bibliografía (Brosse y col., 2009; El Hage y col., 2009; Sannigrahi y col., 2010; Koo y col., 2011).

Se realiza también un proceso organosolv autocatalítico y otro ácido sin autohidrólisis previa que sirve de referencia para comparar los resultados (Figura 5.1). Todas las condiciones de temperatura, tiempo y concentración de catalizador en las diferentes combinaciones de las etapas de autohidrólisis y organosolv se recogen en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6. Condiciones experimentales de la secuencia autohidrólisis-organosolv.

Experimento	Autohidrólisis		Organosolv (50 % de etanol)		
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ácido (%)
ORG ₂₀₀	-	-	200	100	-
AH ₁₅₀ -ORG ₂₀₀	150	30	200	100	-
AH ₁₇₀ -ORG ₂₀₀	170	60	200	100	-
AH ₁₉₀ -ORG ₂₀₀	190	90	200	100	-
ORG _{A-185}	-	-	185	75	1
AH ₁₅₀ -ORG _{A-185}	150	30	185	75	1
AH ₁₇₀ -ORG _{A-185}	170	60	185	75	1
AH ₁₉₀ -ORG _{A-185}	190	90	185	75	1

Las condiciones experimentales de la relación líquido/sólido (10/1 para autohidrólisis y 8/1 para organosolv) y la velocidad de agitación (200 r.p.m.) se mantienen como en los estudios individuales de cada tratamiento. Del mismo modo, el procedimiento de la recuperación de la lignina organosolv se realiza como se detalla en el epígrafe 1.4.3.

5.4. Caracterización de la fase líquida

La caracterización de la fase líquida resultante de los tratamientos consiste en la medida del pH y en la cuantificación de los oligosacáridos, los monosacáridos y los productos de degradación presentes en ella. A continuación se detallan cada uno de los análisis.

5.4.1. Determinación del pH

El pH de la fase líquida procedente de los diferentes tratamientos se mide con un pH-metro modelo GLP 22 de la marca Crison. El calibrado del mismo se realiza con disoluciones tampón de pH 4,01, 7,00 y 9,21.

5.4.2. Cuantificación de los azúcares y los productos de degradación

El análisis de la fase líquida mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) tiene por objetivo la identificación y la cuantificación de los compuestos presentes en ella. Estos análisis se realizan en un cromatógrafo de la marca Agilent, modelo 1260, dotado con un detector de índice de refracción (RID), también modelo 1260. El manejo del equipo, así como el tratamiento y el análisis de los cromatogramas resultantes, se realizan en el programa informático *Chemstation*, también de la marca Agilent.

El HPLC ofrece un método directo para el análisis de azúcares simples en el que se requiere una columna de resina catiónica y un detector de índice de refracción. De los diferentes modos de separación que intervienen en el análisis de monosacáridos, el mecanismo principal implicado es el intercambio de ligando, donde los grupos hidroxilos de los azúcares (con carga negativa) interaccionan con los iones metálicos de la resina (con carga positiva) quedando más o menos retenidos en la columna y así, eluyendo a diferentes tiempos (Transgenomic, 2014).

La cuantificación de los compuestos viene precedida por la realización de las rectas de calibrado de los diferentes analitos. En la Tabla 5.7 se muestran las purezas de

los patrones utilizados para realizar los calibrados de los diferentes compuestos que se han identificado y cuantificado en este trabajo, todos suministrados por Sigma-Aldrich.

Tabla 5.7. Patrones usados para los calibrados de HPLC.

Patrón	Pureza (%)
Ácido acético	≥ 99,7
Ácido fórmico	≥ 95
Ácido levulínico	98
D-(-)-Arabinosa	≥ 98
D-(+)-Galactosa	≥ 99,5
D-(+)-Glucosa	≥ 99,5
D-(+)-Manosa	≥ 99,5
D-(+)-Xilosa	≥ 99
Furfural	99
5-(Hidroximetil)furfural	≥ 99

En la Figura 5.9 se muestra un esquema de las partes que conforman un HPLC. El cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1260 empleado para los análisis realizados en este trabajo presenta cuatro depósitos de fase móvil que están conectados al sistema de bombeo, una bomba cuaternaria que incluye un desgasificador de disolventes a vacío. El sistema de inyección de muestra consiste en un inyector automático que realiza la toma de muestra con un volumen de 20 µL a temperatura ambiente. A través de él, se introduce la muestra a analizar en el sistema cuyos componentes se separan en la columna de cromatografía. Finalmente, los analitos separados se identifican mediante los detectores. En este caso, el detector empleado es el de índice de refracción (RID), ya que es el más adecuado para la cuantificación de azúcares. Este detector se basa en la medida en continuo del índice de refracción del eluente de la columna, en relación a un líquido de referencia (la fase móvil). La presencia de un soluto se determina por los cambios provocados en el índice de refracción.

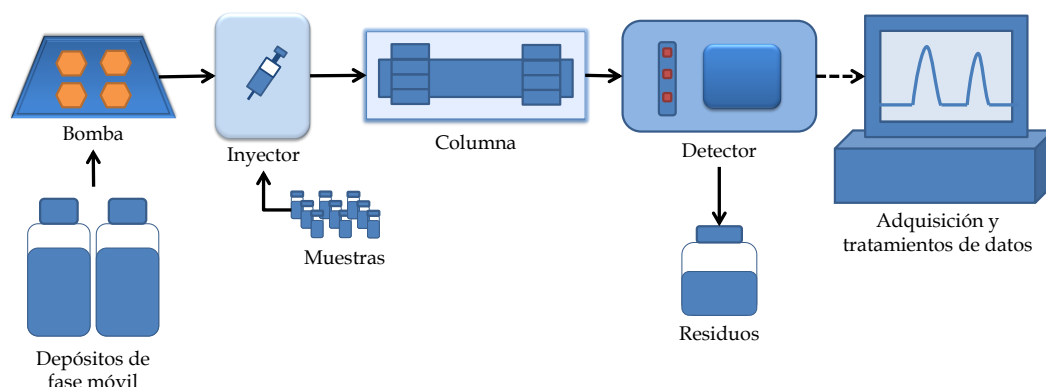


Figura 5.9. Esquema de HPLC.

Las columnas de cromatografía utilizadas para la medida de los monosacáridos y los productos de degradación presentes en las fases líquidas se muestran en la Tabla 5.8, junto con sus características y las condiciones empleadas.

Tabla 5.8. Características y condiciones empleadas en las columnas de HPLC.

	Monosacáridos	Productos de degradación
Modelo	Carbo SepCHO 682	ROA Organic Acid
Marca	Transgenomic	Phenomenex
Relleno	PS-DVB*	PS-DVB*
Forma iónica	Plomo	Hidrógeno
Grado de reticulación (%)	6	8
Tamaño partícula (μm)	7	8
Dimensiones (mm)	300 x 7,8	300 x 7,8
Temperatura columnas (°C)	80	60
Fase móvil	Agua	0,005 M H ₂ SO ₄
Caudal (mL/min)	0,4	0,6
Temperatura RID (°C)	55	45

*PS-DVB: Polimérico estireno-divinilbenceno

Para determinar la concentración de los oligosacáridos, los monosacáridos y los productos de degradación de la fase líquida se toman tres alícuotas y se caracterizan como se describe a continuación.

-
1. La primera alícuota se usa para cuantificar los **monosacáridos** (arabinosa, glucosa, galactosa, manosa y xilosa). Para ello, se neutraliza con carbonato de calcio y se filtra a través de un filtro de nylon de 0,20 μm . A continuación, se analiza empleando la columna Carbo SepCHO 682 con las condiciones detalladas en la Tabla 5.8. Para realizar este análisis, se incorpora una precolumna compuesta por un soporte metálico que incorpora en serie dos cartuchos de 30 x 4,6 mm que presentan diferentes formas iónicas (H^+ y CO_3^-) cuyo fin es la retención de sales. El soporte y los cartuchos son suministrados por la marca Bio-Rad.
 2. La segunda alícuota se utiliza para la medida de los **oligosacáridos**, en la cual se requiere realizar una posthidrólisis. Para ello la fase líquida se hidroliza con ácido sulfúrico en una concentración del 4 % a 121 °C durante 1 h en un autoclave (Marca Selecta, modelo Micro 8). Durante la posthidrólisis, los oligosacáridos de los diferentes azúcares (AO, GIO, GaO, MO y XO) se despolimerizan en los monosacáridos que los componen, de tal forma, que pueden ser cuantificados por diferencia con la concentración inicial de los mismos. El análisis de los monosacáridos procedentes de la posthidrólisis se realiza como ya se ha mencionado en el primer punto.
 3. La última alícuota se destina al análisis de los **productos de degradación** (ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, furfural y 5-hidroximetilfurfural). Esta cuantificación se realiza utilizando la columna ROA Organic Acid, por lo que sólo se requiere la filtración de la muestra a través de un filtro de nylon de 0,20 μm .

La cuantificación de los compuestos presentes en la lejía negra organosolv, azúcares y productos de degradación, se realiza en la columna ROA Organic Acid. En esta columna, los monómeros de xilosa, manosa y galactosa presentan el mismo tiempo de elución y solapan en un único pico, por lo que se cuantifican como un único compuesto. Los otros azúcares, glucosa y arabinosa, así como los productos de degradación, se identifican y cuantifican de forma individual. El análisis de la lejía se realiza tras filtración de la muestra en un filtro de nylon de 0,20 μm , empleando las condiciones indicadas en la Tabla 5.8.

5.5. Caracterización del sólido tratado

Para estudiar el efecto de los tratamientos sobre la madera de pino se caracteriza la fase sólida obtenida, es decir, la madera autohidrolizada y los sólidos deslignificados. En primer lugar, se cuantifica la cantidad de sólido total que queda tras el tratamiento y, a continuación, se determina su composición. Además, el sólido tratado se analiza para conocer sus grupos funcionales y su estabilidad térmica.

5.5.1. Cuantificación de sólidos

El porcentaje de sólidos tratados (ST) obtenidos tras los diferentes tratamientos con respecto a la cantidad introducida al reactor se calcula empleando la siguiente ecuación [5.10].

$$ST (\%) = \frac{m_{ST}}{m_{pino}} \cdot 100 \quad [5.10]$$

donde m_{ST} es la cantidad de sólidos obtenidos tras el tratamiento (g) y m_{pino} es la cantidad de madera de pino introducida al mismo (g), ambos en base seca.

La cuantificación de la humedad de la madera, tanto la tratada como la inicial, se realiza siguiendo la norma NREL/TP-510-42621. El secado de la madera se lleva a cabo en una estufa, de la marca Raypa, a 105 °C empleando crisoles de porcelana. Las pesadas se realizan en una balanza analítica con precisión $\pm 0,1$ mg de la marca Mettler Toledo, modelo MS204S.

5.5.2. Composición en carbohidratos y lignina

La cuantificación de celulosa, hemicelulosa y lignina de los sólidos tratados se realiza, al igual que la caracterización del pino de partida, según las pautas indicadas por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL/TP-510-42618).

En la Figura 5.10 se muestra un esquema simplificado del análisis, que consiste en dos etapas de hidrólisis. En primer lugar, se muele la madera en un molino de bolas (marca Retsch, modelo MM301) a 30 Hz durante 45 segundos. A continuación, se

tamiza la madera molida para trabajar con la fracción retenida entre los tamices de 180 y 850 μm (marca CISA). El ensayo se realiza con una cantidad de muestra de $300,0 \pm 10,0$ mg, sometiéndola a una doble hidrólisis. La primera hidrólisis se realiza añadiendo a cada muestra 3 mL de H_2SO_4 al 72 % (peso/peso) y manteniéndola en un baño de agua a 30 °C durante 1 hora. Tras este paso, se añade a la muestra 84 mL de agua desionizada para diluir la concentración de sulfúrico hasta el 4 %. En estas condiciones, se hace la segunda hidrólisis en un autoclave (modelo Micro 8, marca Selecta) a 121 °C durante 1 hora.

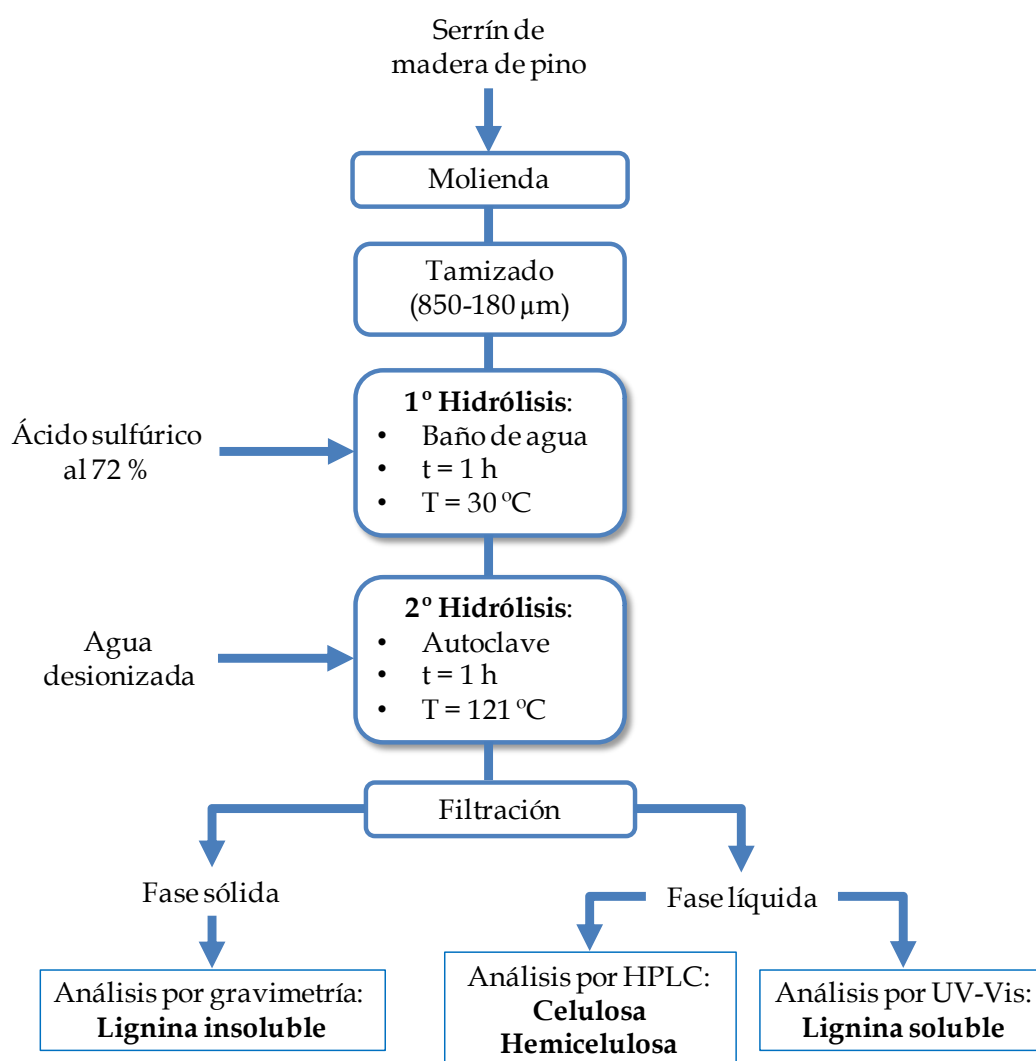


Figura 5.10. Esquema de caracterización de la madera de pino y sólidos tratados (Norma NREL/TP-510-42618).

La disolución obtenida, tras completarse esta etapa, se separa mediante filtración usando un embudo Büchner esmerilado con placa filtrante (porosidad nº 3). El sólido retenido en el filtro es la lignina insoluble o lignina Klason (LI) y se cuantifica, tras su secado total a 105 °C, mediante gravimetría. La fase líquida filtrada contiene la lignina soluble y los azúcares procedentes de hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa. La lignina soluble (LS) se analiza mediante un espectrofotómetro ultravioleta-visible (marca Varian, modelo Cary 50) a una longitud de onda de 240 nm, tras realizar un blanco con agua como referencia. Finalmente, los azúcares se analizan mediante HPLC (marca Agilent, modelo 1260) usando la columna Carbo SepCHO 682 (marca Transgenomic) junto con la precolumna de cartuchos con dos formas iónicas (Bio-Rad), empleando las condiciones de medida indicadas en la Tabla 5.8. En este trabajo se ha considerado que toda la glucosa cuantificada (glucano) corresponde a la celulosa (C), mientras que el resto de azúcares medidos, arabinosa (A), galactosa (Ga), manosa (M) y xilosa (X), pertenecen a los polímeros de la hemicelulosa, arabinano, galactano, manano y xilano, respectivamente.

A partir de la caracterización de los sólidos tratados y su cuantificación, se puede determinar el grado de deslignificación (GD) obtenido en los tratamientos, en ocasiones, también denominado como “*Lignin removal rate*” (Jang y col., 2016). Este parámetro es muy habitual en la bibliografía en tratamientos organosolv (Romaní y col., 2013; Chen y col., 2015; Moniz y col., 2015). Se calcula aplicando la ecuación [5.11] empleada por Constant y col. (2015):

$$GD (\%) = \frac{m_{LI-pino} - m_{LI-ORG}}{m_{LI-pino}} \cdot 100 \quad [5.11]$$

donde $m_{LI-pino}$ es la lignina Klason de la madera de pino y m_{LI-ORG} es la lignina Klason del sólido deslignificado que se calculan a partir de las ecuaciones [5.12] y [5.13].

$$m_{LI-pino} = m_{pino} \cdot LI_{pino} (\%) \quad [5.12]$$

$$m_{LI-ORG} = m_{ST-ORG} \cdot LI_{ORG} (\%) \quad [5.13]$$

donde m_{pino} es la cantidad de madera de pino inicial (g), $m_{\text{ST-ORG}}$ es la cantidad de sólido tratado obtenido tras la deslignificación organosolv (g) y $LI_{\text{pino}}(\%)$ y $LI_{\text{ORG}}(\%)$ son el contenido de lignina Klason en la madera de pino y el sólido deslignificado, respectivamente.

El grado de deslignificación se emplea en este trabajo para evaluar la deslignificación organosolv tanto en los ensayos del diseño de experimentos del proceso de organosolv (ORG), como en los procesos secuenciales autohidrólisis-organosolv (AH-ORG).

También, se determina el rendimiento de lignina precipitada sobre la extraída del sólido inicial ($R_{\text{LP-ORG}}$) como muestra la ecuación [5.14].

$$R_{\text{LP-ORG}} (\%) = \frac{L_{\text{P-ORG}} (\text{g})}{m_{\text{LI-pino}} - m_{\text{LI-ORG}} (\text{g})} \cdot 100 \quad [5.14]$$

donde $L_{\text{P-ORG}}$ es la cantidad de lignina precipitada organosolv expresada en gramos. Este rendimiento se emplea en el diseño de experimentos del proceso organosolv para evaluar la lignina recuperada tras este tratamiento.

5.5.3. Estabilidad térmica

Los sólidos tratados, la madera autohidrolizada y los sólidos deslignificados, se caracterizan mediante análisis termogravimétrico para determinar su estabilidad térmica. Esta técnica ha sido previamente aplicada para conocer la estabilidad térmica de los materiales lignocelulósicos sometidos a diferentes tratamientos en trabajos encontrados en bibliografía (Biswass y col., 2011; Xiao y col., 2011; Sun y col., 2015; Michelin y Texeira, 2016).

El análisis termogravimétrico se basa en el registro continuo de la variación de la masa del material en estudio, a medida que se varía la temperatura a una velocidad fija (análisis dinámico) o bien manteniendo una temperatura constante (análisis isotérmico). Se puede llevar a cabo bajo atmósfera inerte o en presencia de oxígeno

(Cheng y col., 2012). En la Figura 5.11 se muestra un esquema de la termobalanza donde se realizan los ensayos.

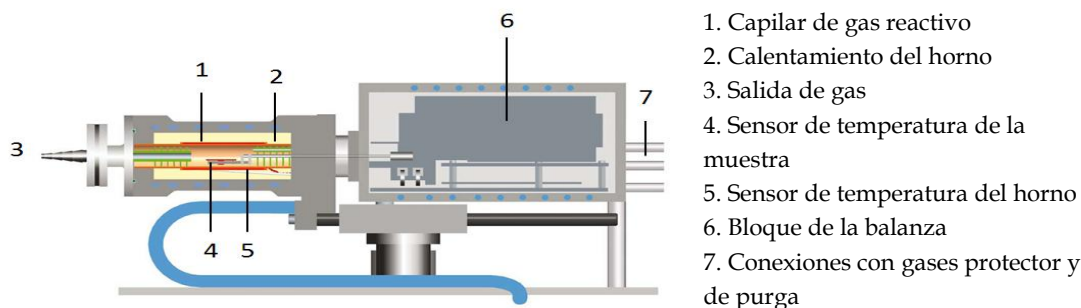


Figura 5.11. Esquema de una termobalanza de TGA (suministrado por Mettler-Toledo).

Los análisis termograviméticos de los sólidos tratados se llevan a cabo bajo condiciones dinámicas y en atmósfera inerte de nitrógeno. Para cada ensayo, se introduce una cantidad de 8-9 mg de sólido tratado en polvo en crisoles de alúmina estándar de 70 μ L. El resto de las condiciones del método se recogen en la Tabla 5.9.

Tabla 5.9. Condiciones de operación en los análisis termogravimétricos.

Característica	Valor
Velocidad de calentamiento ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	10
Intervalo de temperatura de barrido ($^{\circ}\text{C}$)	30-900
Caudal de gas de reacción ($\text{mL}/\text{min N}_2$)	30
Caudal de gas de protección ($\text{mL}/\text{min N}_2$)	20

El equipo donde se realizan estos ensayos es un analizador termogravimétrico modelo TGA/DSC1 de la marca Mettler-Toledo, provisto del software STAR^e de la misma marca.

En la Figura 5.12 se muestra, a modo de ejemplo, un termograma y su derivada (DTG) de la madera de pino de partida, en la que se identifican los parámetros de degradación que se determinan en este estudio.

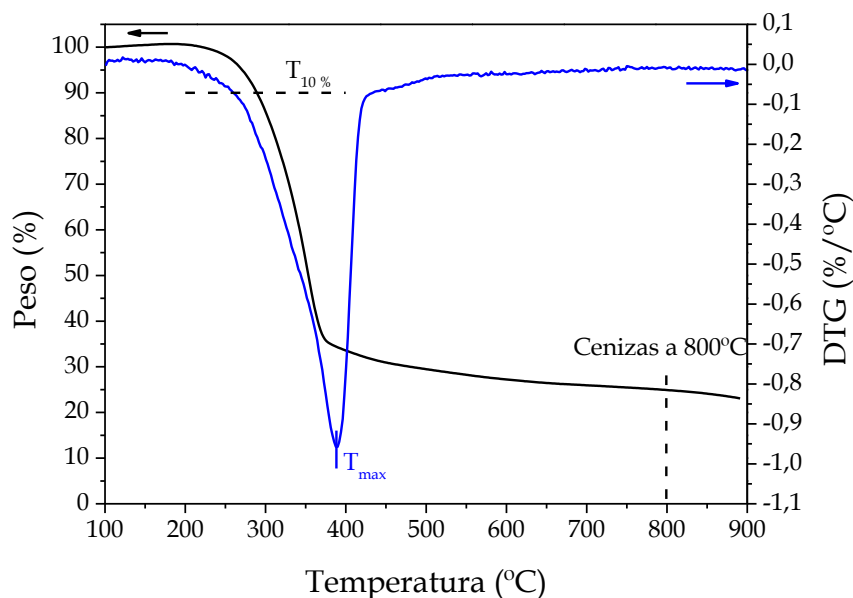


Figura 5.12. Curva y derivada de TGA de madera de pino.

Los parámetros de degradación térmica indicados en el termograma y su derivada (Figura 5.12) se detallan a continuación:

- Temperatura de degradación al 10 % ($T_{10\%}$): temperatura en la que la muestra ha perdido el 10 % de peso respecto a su peso inicial.
- Temperatura de degradación máxima (T_{max}): temperatura en la cual se alcanza la máxima velocidad de degradación.
- Cenizas a 800 °C: cantidad de masa que permanece cuando la temperatura alcanza los 800 °C.

5.5.4. Grupos funcionales

La espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) se ha utilizado para identificar los grupos funcionales presentes en los sólidos resultantes de los diferentes tratamientos (la madera autohidrolizada y los sólidos deslignificados).

Los espectros de absorción de especies moleculares en el infrarrojo son el resultado de los distintos cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros. En esta región, la radiación incidente de frecuencia “ ν ” coincide con la del salto vibracional. Esta vibración excitada por “ ν ” modifica el momento dipolar “ μ ” del enlace y da lugar a la absorción (Llorente y Horta, 1991; Skoog y col., 2000). En este trabajo, los análisis mediante FTIR se han realizado en el intervalo de 4.000-400 cm^{-1} , correspondiente a la región del infrarrojo fundamental, debido a que es el intervalo de longitudes de onda dentro del cual se produce la absorción (Llorente y Horta, 1991).

El método empleado para el análisis por FTIR es el de la pastilla de bromuro potásico. La muestra de madera pretratada en polvo se mezcla con KBr y se comprime en un molde para formar una pastilla. La relación usada de muestra/KBr es 1/200. La mezcla de ambos compuestos y su homogeneización se realiza en un mortero de ágata y la compresión para formar la pastilla se lleva a cabo en una prensa hidráulica de la marca SPECAC, aplicando una presión de 7 toneladas durante 30 segundos. La pastilla se analiza en un espectrofotómetro de la marca JASCO, modelo 4700, cuyas condiciones de análisis son 16 barridos y una resolución de 4 cm^{-1} . El procesado y análisis de datos se realiza con el programa informático *Spectra Manager*.

Las bandas características de los espectros FTIR de los sólidos tratados (madera autohidrolizada y sólidos deslignificados), correspondientes a la hemicelulosa, la celulosa y la lignina que los componen, se recogen en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10. Bandas características de los espectros FTIR para materiales lignocelulósicos (Pandey, 1999; Colom y col., 2003; Schwanninger y col., 2004).

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupos funcionales	Compuesto
1735	Grupos acetilo de la hemicelulosa	Hemicelulosa
1660	C=O estiramiento (conjugado)	Lignina
1596	Vibración del esqueleto aromático con estiramiento de C=O	Lignina
1512	Vibración del esqueleto aromático	Lignina
1464	Deformaciones asimétricas de C-H	Lignina
1426	Vibración del esqueleto aromático combinada con deformación de C-H en el plano	Celulosa
1370	Estiramiento de C-H alifático en CH ₃	Lignina
1340	Deformación de OH en el plano	Celulosa
1267	Unidades G con estiramiento de C=O	Lignina
1160	Estiramiento de C-O-C asimétrico	Celulosa
1111	Estiramiento asimétrico del anillo de glucosa	Celulosa
1055	Estiramiento de C-O en alcoholes secundarios	Celulosa
898	Estiramiento del anillo de glucosa	Celulosa

Esta técnica ha sido usada en bibliografía para caracterizar los materiales lignocelulósicos sometidos a diferentes tratamientos y así determinar los cambios estructurales producidos por los mismos (Adel y col., 2010; Goshadrou y col., 2013; Sun y col., 2014c; Sun y col., 2015; Brienzo y col., 2017).

5.6. Caracterización de la lignina organosolv

Las ligninas organosolv obtenidas en los diferentes ensayos experimentales (procedentes del diseño de experimentos y los tratamientos secuenciales) se analizan para determinar su distribución de pesos moleculares, así como su estabilidad térmica.

5.6.1. Distribución de pesos moleculares

Para determinar la distribución de pesos moleculares de las ligninas organosolv obtenidas se utiliza la cromatografía de permeación en gel (GPC). Se trata de un tipo de cromatografía de líquidos, cuyo mecanismo de separación se basa en el tamaño de las moléculas poliméricas en disolución.

En un principio, las medidas de GPC convencionales se hacían con un único detector de concentración, presentando ciertas limitaciones. Sin embargo, la combinación de varios detectores proporciona mayor información sobre la muestra analizada. Existen diferentes detectores para estos análisis GPC como son los de viscosidad, de dispersión de luz (*light scattering*) y de índice de refracción.

En este trabajo, los análisis de GPC se llevan a cabo usando dos detectores: un viscosímetro y un detector de índice de refracción. Para ello, el detector de viscosidad (modelo 390-LC de la marca Varian) se incorpora en serie entre los detectores del HPLC (Agilent 1260). El tratamiento de datos se realiza con el software *Cirrus GPC Multi Detector*, donde se trabaja con las señales obtenidas a partir del detector de índice de refracción y de viscosidad para determinar los parámetros de las ligninas.

Para el análisis de las ligninas se emplean dos columnas en serie, cuyo modelo es PolarGel-M de la marca Varian, junto con una precolumna de la misma marca y modelo, cuyas dimensiones son 50 x 7,5 mm. Estas columnas tienen un relleno compuesto por partículas de 8 µm de un copolímero macroporoso, cuya superficie presenta tanto componentes hidrófobos como hidrófilos. De esta manera, presentan la ventaja de poder ser utilizadas con fases móviles orgánicas o en combinación con acuosas. En este caso, se utiliza como fase móvil la dimetilformamida (DMF), en la cual se añade un 0,1 % de bromuro de litio (LiBr) para reducir el estado de agregación de la muestra y facilitar la medida. Todas las condiciones de medida utilizadas para los análisis mediante GPC se recogen en la Tabla 5.11.

Tabla 5.11. Condiciones de medida en GPC.

Característica	Valor
Concentración de lignina (mg/mL)	5
Fase móvil	DMF + 0,1 % LiBr
Caudal de fase móvil (mL/min)	0,6
Volumen de inyección (μL)	50
Tiempo de inyección (min)	100
Detectores	-Índice de refracción -Viscosímetro
Temperatura viscosímetro (°C)	40
Temperatura RID (°C)	40
Columnas	2 x PolarGel-M
Dimensiones de columnas (mm)	300 x 7,5
Temperatura columnas (°C)	40

En ocasiones, polímeros con el mismo peso molecular presentan diferentes rectas de calibrado frente al tiempo, debido a su diferente interacción con el disolvente. Al incorporar el parámetro de la viscosidad intrínseca se consigue una misma respuesta de los polímeros (Agilent, 2015). Mediante el análisis con dos detectores, se tiene en cuenta tanto el peso molecular como la viscosidad intrínseca del polímero. De esta forma, se puede llevar a cabo un calibrado universal, en el cual se representa el logaritmo del producto del peso molecular por la viscosidad intrínseca frente al tiempo de retención.

Para la realización del calibrado se usa un kit de patrones de poliestireno de alto peso molecular (EasiVial PS-H, marca Agilent). Se trata de viales rellenos con diferentes concentraciones de poliestireno y de distintos pesos moleculares, que varían en el intervalo de 162 a 6.870.000 g/mol. En la Tabla 5.12 se muestran los valores de la viscosidad intrínseca (IV), la polidispersidad (M_w/M_n) y el pico del peso molecular (M_p) de los patrones empleados para llevar a cabo el calibrado.

Tabla 5.12. Patrones EasiVial PS-H para el calibrado de GPC.

Código vial	IV (L/g)	M_w/M_n	M_p (g/mol)
Vial rojo	8,4189	1,09	6.870.000
	1,2216	1,03	483.400
	0,1360	1,03	19.540
	0,0328	1,06	1.320
Vial amarillo	4,7639	1,08	3.242.000
	0,7552	1,03	224.900
	0,0900	1,03	9.970
	0,0231	1,11	580
Vial verde	2,1965	1,05	990.500
	0,3460	1,02	74.800
	0,0593	1,04	4.830
	-	1	162

A partir de la inyección de los patrones se determinan las constantes de los detectores, K_{RI} y K_{DP} , y se lleva a cabo el calibrado universal mostrado en la Figura 5.13.

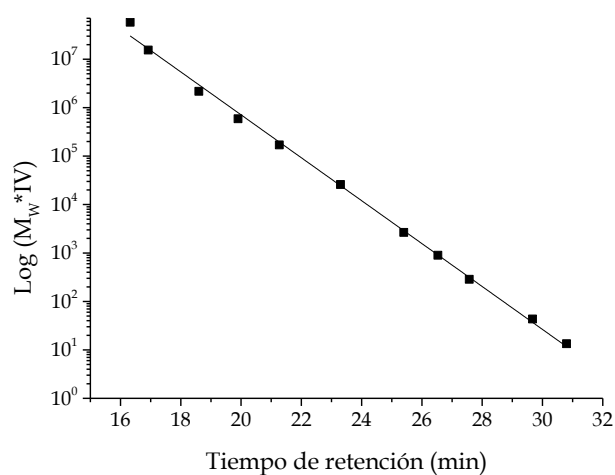


Figura 5.13. Curva de calibrado de GPC.

Los diferentes parámetros obtenidos en este estudio que caracterizan las ligninas organosolv analizadas son:

- Pico de peso molecular (M_p): indica el valor más alto de peso molecular presente en el polímero.
- Peso molecular promedio en número (M_n): muestra la longitud de cadena media del polímero.
- Peso molecular promedio en peso (M_w): indica proporción de material de mayor peso molecular.
- Polidispersidad (M_w/M_n): medida de la amplitud de la distribución de pesos moleculares.

5.6.2. Parámetros térmicos

El uso del análisis termogravimétrico para caracterizar las ligninas organosolv ha sido ampliamente utilizado en bibliografía (Domínguez y col., 2008; Huijgen y col., 2014; Hussin y col. 2014; Zhang y col., 2016c). En este trabajo, este análisis se realiza en el equipo TGA/DSC1 de la marca Mettler-Toledo. Una muestra de lignina en polvo de 8-9 mg se introduce en un crisol de alúmina de 70 μ L y se analiza bajo las condiciones de medida que se muestran en la Tabla 5.13.

Tabla 5.13. Condiciones de operación en los análisis termogravimétricos de lignina.

Característica	Valor
Velocidad de calentamiento ($^{\circ}$ C/min)	10
Intervalo de temperatura de barrido ($^{\circ}$ C)	30-900
Caudal de gas de reacción (mL/min N_2)	20
Caudal de gas de protección (mL/min N_2)	20

Los parámetros de degradación térmica que se estudian son la temperatura de degradación al 25 % ($T_{25\%}$) y el porcentaje de cenizas a 800 $^{\circ}$ C.

5.7. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es la etapa final del proceso estudiado en este trabajo. En ella, los sólidos deslignificados obtenidos en los procesos organosolv (ORG₂₀₀ y ORG_{A-185}) y en las secuencias de tratamientos autohidrólisis-organosolv (AH-ORG₂₀₀ y AH-ORG_{A-185}), se utilizan como sustrato en la sacarificación por vía enzimática para convertir la celulosa presente en ellos en glucosa. Para cuantificar la conversión se mide la concentración de glucosa liberada mediante HPLC y se calcula el rendimiento de la hidrólisis.

A continuación, se detallan los reactivos empleados y el procedimiento experimental llevado a cabo para realizar la hidrólisis enzimática de los sólidos deslignificados, describiendo también el método de análisis para cuantificar la glucosa.

5.7.1. Reactivos y equipo experimental de hidrólisis

En esta etapa de hidrólisis se utiliza el complejo enzimático ACCELLERASE 1500, que fue suministrado por la empresa Dupont (Genencor). Este complejo contiene diferentes actividades enzimáticas, principalmente, exoglucanasa, endoglucosana, hemicelulasa y β -glucosidasa. Las características que presenta este complejo de acuerdo con el suministrador son las siguientes:

- Actividad de la endoglucanasa: 2200-2800 CMC U/g (unidades de carboximetilcelulosa, que expresan la liberación de 1 μ mol de glucosa equivalente en un minuto bajo las condiciones de ensayo de 50 °C y pH = 4,8).
- Actividad de la β -glucosidasa: 450-775 pNPG U/g (unidades de pNP-glucosidasa indican 1 μ mol de nitrofenol liberado por para-nitrofenil-B-D-glucopiranososa en un minuto bajo las condiciones de ensayo de 50 °C y pH = 4,8).
- El valor del pH del complejo enzimático: 3,9-4,3.

El resto de reactivos necesarios para llevar a cabo la etapa de hidrólisis enzimática se recogen en la Tabla 5.14, indicando su pureza y marca comercial.

Tabla 5.14. Reactivos empleados en la hidrólisis enzimática.

Reactivo	Pureza (%)	Marca
Ácido cítrico monohidratado	99,5-100,5	Panreac Química S.L.U
Agua ^a	-	Panreac Química S.L.U
Azida de sodio	≥ 99,5	Sigma-Aldrich
Citrato de sodio dihidratado	≥ 99	Sigma-Aldrich

^a: grado HPLC

Los ensayos de hidrólisis enzimática se realizan en un incubador orbital modelo KS 4000 i control de la marca IKA, con control de temperatura y velocidad de agitación (Figura 5.14), utilizando matraces erlenmeyer de un volumen de 50 mL cerrados herméticamente con un tapón de goma.



Figura 5.14. Incubador IKA modelo KS 4000 i.

5.7.2. Caracterización de la enzima

El complejo enzimático ACCELLERASE 1500 se caracteriza mediante la cuantificación de las proteínas presentes en él. Para ello, se sigue el procedimiento marcado por el kit de ensayo de proteínas de ácido bicinonínico (BCA) de la marca *Thermo Scientific Pierce*. Se preparan las diluciones para realizar la curva de calibrado con el estándar de proteínas seroalbúmina bovina (BSA). A continuación, se añade sobre las diluciones del calibrado del BSA y sobre las muestras de enzima a analizar un reactivo compuesto por el BCA y sulfato de cobre.

Todas las mezclas se incuban en un baño de agua a 37 °C durante 30 min para que se produzca la reacción de Biuret, basada en la formación de un complejo quelante al poner en contacto una proteína con un medio alcalino. Tras la incubación, las muestras se analizan por espectroscopía UV-visible a una longitud de onda de 562 nm en un espectrofotómetro de la marca Varian, modelo Cary 50. Finalmente, se determina la concentración de proteínas de las enzimas, expresándolo en mg/mL.

5.7.3. Procedimiento operativo de hidrólisis

El procedimiento llevado a cabo en la hidrólisis enzimática se esquematiza en la Figura 5.15, en la cual se incluyen la preparación del medio de reacción de la hidrólisis, la incubación y la toma de muestra y, finalmente, el análisis de la glucosa.

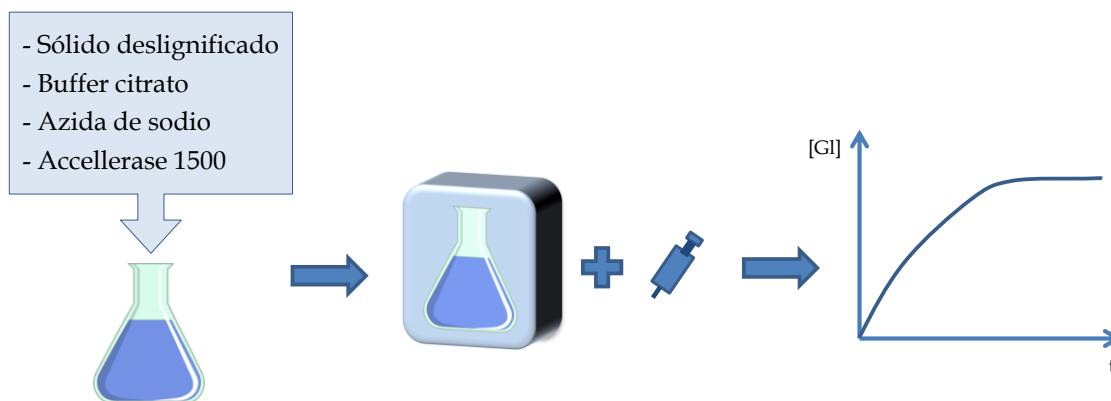


Figura 5.15. Esquema de la hidrólisis enzimática.

Para los ensayos de hidrólisis enzimática de los sólidos deslignificados se utiliza como medio de reacción una disolución tampón. Se trata de un buffer citrato de sodio 50 mM, que se prepara a partir de la disolución de citrato de sodio dihidratado y ácido cítrico monohidratado. Para evitar el crecimiento microbiano, se agrega azida de sodio a la disolución con una concentración de 50 mg/mL, como se indica en la norma NREL/TP-5100-63351. A continuación, se añade el complejo enzimático Accellerase 1500 y se introducen en el incubador, momento en el que comienza la reacción. La carga de la enzima en la disolución se añade en función de la masa de sólido deslignificado de acuerdo con la bibliografía (Huijgen y col., 2012; Chen y col., 2014).

La temperatura de hidrólisis, el pH del buffer y la carga de biomasa empleados se fijan en base a las recomendaciones del suministrador de la enzima (Dupont, Genencor). Se ha utilizado una velocidad de agitación de 150 r.p.m. por ser el valor habitual en estudios anteriores con este complejo enzimático (Govumoni y col., 2013; Hiden y col., 2013). Las condiciones utilizadas en los ensayos de hidrólisis enzimática se recogen en la Tabla 5.15.

Tabla 5.15. Características de operación de hidrólisis enzimática.

Condiciones de operación	Valor
Carga de enzima	0,25 mL/g madera pretratada
Temperatura (°C)	50
pH de buffer	5
Carga de biomasa	7 % (madera pretratada/buffer)
Velocidad de agitación (r.p.m.)	150

El seguimiento de hidrólisis enzimática se lleva a cabo tomando muestras de 100 µL a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de la reacción. Estas muestras se introducen en el congelador (T = -4 °C) a fin de detener la hidrólisis y se conservan hasta realizar el análisis de la glucosa para estudiar la evolución de la reacción.

5.7.4. Cuantificación de la glucosa

Las muestras tomadas a diferentes tiempos de la reacción de hidrólisis se diluyen con un factor de 1/10 y se filtran con un filtro de jeringa de tamaño de poro igual a 0,20 µm, previo a su análisis, para cuantificar la glucosa liberada durante la hidrólisis enzimática.

El análisis de dichas muestras se realiza mediante HPLC, usando la columna Carbo SepCHO 682 con las condiciones que se especificaron en la Tabla 5.8. Además, se incorpora una precolumna, modelo GC-682 de la marca Teknokroma, con un cartucho que presenta la misma forma iónica de la columna analítica para evitar la entrada de impurezas a la misma.

El rendimiento de hidrólisis enzimática (R_{HE}) de los sólidos tratados se determina a partir de la ecuación [5.15].

$$R_{HE}(\%) = \frac{Gl(g) \cdot 0,9}{C_{ST}(g)} \cdot 100 \quad [5.15]$$

donde Gl corresponde a la glucosa cuantificada en la fase líquida hidrolizada, el factor 0,9 hace referencia a la corrección anhidro y C_{ST} es la celulosa (glucano) del sólido tratado empleado como sustrato, obtenido a partir de la cantidad de sólido tratado y la caracterización NREL (apartado 5.5.2).

6. AUTOHIDRÓLISIS. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. AUTOHIDRÓLISIS. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se exponen los resultados y la discusión del estudio de la extracción de hemicelulosas de la madera de *Pinus radiata* mediante un tratamiento de autohidrólisis. Se emplea la metodología del diseño de experimentos para estudiar la influencia de la temperatura y el tiempo del tratamiento sobre la composición de las dos fases obtenidas. La madera autohidrolizada se caracteriza determinando su contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina. Además se evalúa su estabilidad térmica y el cambio de grupos funcionales al modificar las variables del tratamiento. Por otro lado, se analiza la fase líquida obtenida a través de la medida del pH y la cuantificación de los compuestos presentes en ella, como son oligosacáridos, monosacáridos y productos de degradación. Se pretende encontrar las condiciones de temperatura y tiempo de tratamiento que den lugar a la máxima recuperación de hemicelulosas de la madera de pino, pero sin que éstas se encuentren degradadas en la fase líquida.

6.1. Caracterización de la madera autohidrolizada

En este apartado se exponen los resultados de las variables dependientes obtenidas para los 11 experimentos del diseño del tratamiento de autohidrólisis para la fase sólida (madera autohidrolizada). Se cuantifica el sólido y se determina su contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina. Finalmente, el estudio se completa con el análisis de la madera autohidrolizada de los diferentes ensayos mediante termogravimetría y espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier.

6.1.1. Determinación gravimétrica

El porcentaje de los sólidos tratados en cada ensayo del diseño de experimentos de autohidrólisis (ST_{AH}) se calcula a partir de la cantidad de la madera autohidrolizada obtenida tras el tratamiento, aplicando la ecuación [5.10] tras la gravimetría. Los resultados obtenidos en los sólidos tratados de estos ensayos se muestran en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Porcentaje de sólidos tras la autohidrólisis.

Experimento	ST_{AH} (%)
AH-1	85,0
AH-2	77,8
AH-3	89,9
AH-4	83,4
AH-5	91,4
AH-6	64,6
AH-7	72,2
AH-8	68,8
AH-9	72,0
AH-10	79,0
AH-11	77,3

A partir de estos datos, se obtienen los efectos principales de la temperatura (T) y el tiempo (t) y los efectos de sus interacciones sobre el porcentaje de los sólidos tratados mediante autohidrólisis (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre ST_{AH} .

Efecto	Valor \pm Error
T	-17,600 \pm 0,618
t	-6,950 \pm 0,618
T ²	0,079 \pm 0,735
Tt	1,650 \pm 0,874
t ²	0,679 \pm 0,735
Media	78,033 \pm 0,504

El análisis de varianza de los efectos mencionados se recoge en la Tabla 6.3. En este estudio se ha considerado un nivel de significancia del 95 % y un valor tabulado de la distribución de Fisher igual a 18,51 al tener en cuenta los grados de libertad del efecto (1) y los del error puro (2). Aquellos efectos con valores de F superiores a dicho valor teórico se consideran significativos. También, otro parámetro de exclusión de efectos es el valor de la probabilidad P , por el cual aquellos valores que tengan un valor de P superior a 0,05 son debidos al azar. Aplicando dos criterios, en este estudio del porcentaje de los sólidos tras la autohidrólisis (ST_{AH}), los efectos significativos son la temperatura y el tiempo. El resto de efectos no cumplen los criterios, por tanto, son no significativos y se muestran en rojo. A su vez, se recogen los valores correspondientes a la falta de ajuste del modelo antes y después de considerar los efectos no significativos en el mismo.

Tabla 6.3. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre ST_{AH} .

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
T	619,536	1	619,536	811,62	0,0012
t	96,618	1	96,618	126,57	0,0078
T ²	0,009	1	0,009	0,01	0,9241
Tt	2,723	1	2,723	3,57	0,1996
t ²	0,651	1	0,651	0,85	0,4532
Falta de ajuste	(12,572) 15,968	(3) 6	(4,191) 2,661	(5,49) 3,49	(0,1579) 0,2396
Error puro	1,527	2	0,763		
Total	733,649	10			

(): Valores para la falta de ajuste del análisis de varianza inicial

A continuación se muestra el modelo obtenido para el porcentaje de madera autohidrolizada mediante el ajuste de los resultados experimentales. También se exponen el coeficiente de correlación (R^2), el error estándar de la estimación y el error medio absoluto.

ST_{AH} (%)	
$ST_{AH} (\%) = 160,061 - 0,440008T - 0,115842t$	[6.1]
$R^2 = 97,61 \%$	
Error estándar de la estimación = 0,8737	
Error medio absoluto = 1,069	

En la Figura 6.1 se comprueba la bondad del ajuste, donde se representan los valores experimentales frente a los obtenidos al aplicar el modelo. Dado que todos los puntos están muy próximos a la diagonal, el ajuste se puede considerar bueno.

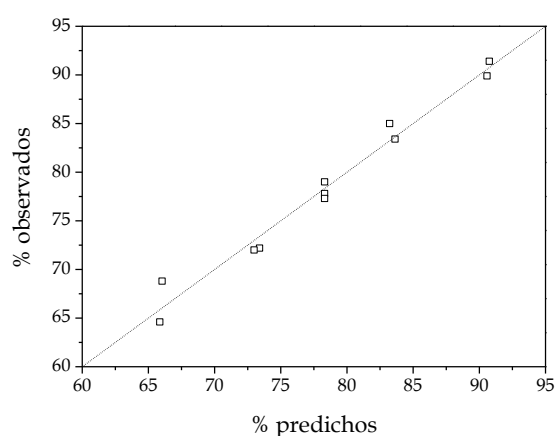


Figura 6.1. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para ST_{AH} (%).

En la Figura 6.2 se muestra el mapa de contorno del porcentaje de los sólidos tras la autohidrólisis obtenido con el modelo estadístico de la ecuación [6.1].

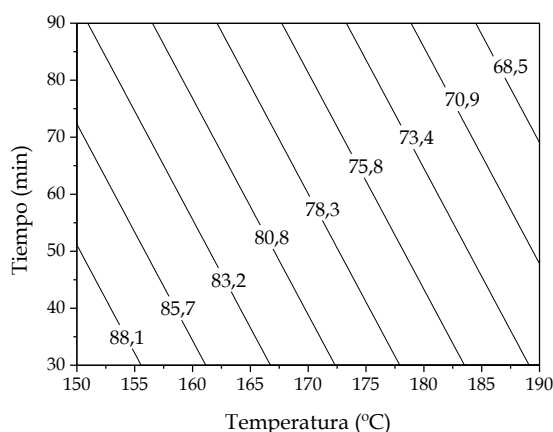


Figura 6.2. Mapa de contorno de ST_{AH} (%).

Se observa cómo a medida que se incrementan las condiciones de temperatura y tiempo, la cantidad de sólido tratado es menor por la despolimerización y solubilización de las hemicelulosas en la fase líquida (Ruiz y col., 2013; Ertas y col., 2014; Gonçalves y col., 2015). Además, bajo las temperaturas de operación seleccionadas, también se consigue la eliminación de los extractos de la madera de pino. En estudios previos de tratamientos hidrotérmicos, aplicando temperaturas entre los 130 y 140 °C, se confirmaba la eliminación de los extractos entre los que se encontraban compuestos fenólicos como estilbenos, lignanos o flavonoides (Gonzalez-Muñoz y col., 2012; Conde y col., 2013). La pérdida de la fracción hemicelulósica de la madera, así como de pequeños porcentajes de celulosa y lignina, se comprueba en los análisis de la caracterización del sólido (apartado 6.1.2).

El porcentaje de los sólidos tratados (ST_{AH}) se encuentra entre un 65 y 90 % sobre la cantidad inicial de madera de pino, siendo valores muy próximos a los resultados mostrados por otro tipo de materiales lignocelulósicos, empleando condiciones experimentales de autohidrólisis similares. Gütsch y col. (2012) obtuvieron entre un 65 y 95 % de la madera de *Eucalyptus globulus* al trabajar con temperaturas entre los 150 y 200 °C; mientras que Amiri y Karimi (2015) obtuvieron un 80 % partiendo de madera de olmo al someterla a 180 °C y 60 min. En la misma línea se encuentran los resultados de Gonçalves y col. (2015), al utilizar diferentes residuos de coco como materia prima y temperaturas entre los 160 y 200 °C con tiempos entre 10 y 50 min.

6.1.2. Composición

El porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina de la madera de pino y de la madera autohidrolizada obtenida en los ensayos del diseño de experimentos de autohidrólisis se recoge en la Tabla 6.4. La celulosa corresponde al glucano (C_{AH}); mientras que la hemicelulosa se presenta en forma de los polímeros que la conforman: xilano (X_{AH}), galactano (G_{AH}) y manano (M_{AH}). La lignina se presenta en su fracción soluble (LS_{AH}) e insoluble (LI_{AH}). Además, se exponen entre paréntesis los resultados en masa referidos a una base de cálculo de 100 g de madera de pino, donde se tiene en cuenta tanto la composición de la madera autohidrolizada como la cantidad de los sólidos tratados obtenidos tras la autohidrólisis.

Tabla 6.4. Contenido en carbohidratos y lignina de la madera autohidrolizada expresado en g/100 g de madera autohidrolizada.

Expt.	C_{AH}	X_{AH}	G_{AH}	M_{AH}	LS_{AH}	LI_{AH}
Pino	43,8	5,4	3,1	10,4	5,4	26,6
AH-1	49,7 (42,2)	4,1 (3,5)	3,1 (2,7)	8,6 (7,3)	4,1 (3,5)	30,6 (26)
AH-2	51,8 (40,3)	2,9 (2,3)	2,0 (1,5)	5,4 (4,2)	3,8 (3)	34,0 (26,5)
AH-3	46,5 (41,8)	4,6 (4,1)	3,4 (3)	11,0 (9,9)	4,3 (3,9)	28,5 (25,6)
AH-4	49,4 (41,2)	3,9 (3,3)	2,9 (2,4)	8,7 (7,3)	4,4 (3,7)	30,1 (25,1)
AH-5	47,0 (42,9)	4,6 (4,2)	3,3 (3)	10,9 (10)	4,6 (4,2)	28,2 (25,8)
AH-6	56,2 (36,3)	1,0 (0,7)	1,0 (0,6)	0,8 (0,5)	3,2 (2,1)	37,6 (24,3)
AH-7	54,1 (39,1)	2,8 (2)	1,8 (1,3)	4,0 (2,9)	3,3 (2,4)	34,8 (25,1)
AH-8	56,1 (38,6)	1,3 (0,9)	1,2 (0,8)	1,0 (0,7)	3,5 (2,4)	37,9 (26,1)
AH-9	54,5 (39,2)	2,4 (1,7)	1,7 (1,2)	3,6 (2,6)	3,7 (2,6)	36,5 (26,2)
AH-10	51,8 (40,9)	3,0 (2,3)	1,9 (1,5)	5,5 (4,3)	4,0 (3,1)	33,7 (26,6)
AH-11	52,3 (40,4)	2,9 (2,3)	2,1 (1,6)	5,3 (4,1)	3,7 (2,8)	33,4 (25,8)

(): g/100 g de madera de pino

A continuación se expone el análisis de las tres fracciones principales de la madera autohidrolizada: celulosa, hemicelulosa y lignina.

6.1.2.1. Celulosa

En la Tabla 6.5 se muestra el valor de los efectos principales, la temperatura y el tiempo, junto con sus interacciones y el valor de sus errores sobre el porcentaje de la celulosa (C_{AH} (%)) presente en la madera autohidrolizada.

Tabla 6.5. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre C_{AH} .

Efecto	Valor \pm Error
T	6,928 \pm 0,204
t	2,681 \pm 0,204
T ²	-0,429 \pm 0,243
Tt	-0,650 \pm 0,289
t ²	-0,129 \pm 0,243
Media	51,967 \pm 0,167

El resultado del análisis de varianza llevado a cabo sobre esta respuesta se muestra en la Tabla 6.6. Los criterios para excluir efectos son los anteriormente citados, que la distribución de Fisher (F) sea mayor a 18,51 y que la probabilidad P sea menor a 0,05, de tal forma que los efectos no sean debidos al azar. Al igual que en la respuesta del porcentaje de los sólidos tratados tras la autohidrólisis (ST_{AH}), sólo la temperatura y el tiempo presentan efectos significativos sobre el porcentaje de celulosa en el sólido.

Tabla 6.6. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre C_{AH} .

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
T	95,986	1	95,986	1151,83	0,0009
t	14,372	1	14,372	172,46	0,0057
T ²	0,260	1	0,260	3,12	0,2194
Tt	0,423	1	0,423	5,07	0,1532
t ²	0,024	1	0,024	0,28	0,6481
Falta de ajuste	(0,759)	(3)	(0,253)	(3,04)	(0,2576)
	1,441	6	0,240	2,88	0,2798
Error puro	0,167	2	0,083		
Total	111,965	10			

(): Valores para la falta de ajuste del análisis de varianza inicial

El ajuste de los resultados experimentales mediante regresión a una función lineal que incluye los términos correspondientes a los efectos significativos (T y t) da lugar al

modelo que muestra la ecuación [6.2]. Asimismo, se incluye el coeficiente de correlación, el error estándar de la estimación y el medio absoluto.

Celulosa _{AH} (%)
$C_{AH} (\%) = 19,6402 + 0,173193T + 0,0446773t$ <div style="text-align: right;">[6.2]</div>
$R^2 = 98,56 \%$
Error estándar de la estimación = 0,289
Error medio absoluto = 0,327

La bondad del ajuste del modelo obtenido se comprueba mediante la gráfica de valores observados frente a predichos (Figura 6.3), ya que todos los puntos se distribuyen cerca de la diagonal.

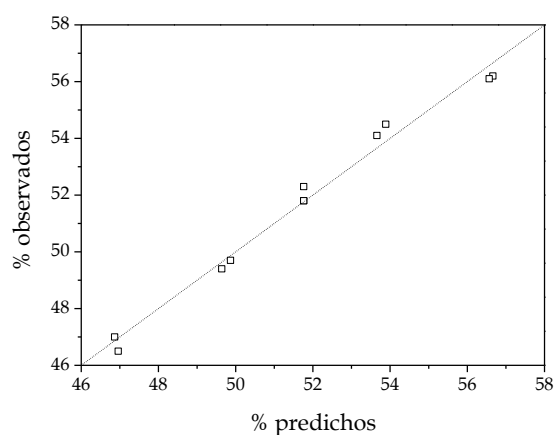


Figura 6.3. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para C_{AH} (%).

En la Figura 6.4 se muestra el mapa de contorno de la celulosa en la madera autohidrolizada, donde se observa que el porcentaje de la celulosa aumenta a la vez que se incrementa la temperatura y el tiempo de tratamiento.

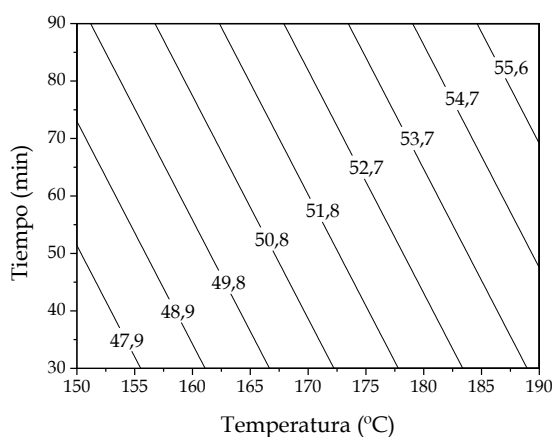


Figura 6.4. Mapa de contorno de C_{AH} (%).

El porcentaje de celulosa es de un 46 % en las condiciones más suaves (AH-3, 150 °C y 30 min) y asciende hasta un 56 % bajo las condiciones más severas (AH-8, 190 °C y 90 min). Este hecho se debe a la solubilización de las fracciones hemicelulósicas de la madera de pino en la fase líquida que será discutido en el epígrafe 6.1.2.2.

La cantidad de celulosa se encuentra en el intervalo de 36 a 43 g/100 g de materia prima. Estos datos suponen que se mantenga en el sólido entre un 83 y 98 % de la celulosa de partida. La celulosa que no permanece en la fase sólida, y se solubiliza en la fase líquida, es aquella que se asocia con sus regiones más amorfas y que son más fácilmente hidrolizables que las cristalinas (Gütsch y col., 2012; Krogell y col., 2013; Li y col., 2014a). El valor medio de la celulosa inicial que permanece en la madera tratada es del 92 %. Este valor es muy próximo al 94 % conseguido por Buruiana y col. (2014) al estudiar la autohidrólisis de rastrojos de maíz en condiciones no isotermas entre los 180 y 223 °C y algo menor al valor medio de 98,5 % obtenido por Romaní y col. (2010) empleando madera de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y operando también en condiciones no isotermas con intervalos de temperatura entre 195 y 230 °C.

Por tanto, el tratamiento de autohidrólisis permite liberar gran parte de las hemicelulosas de la madera de partida sin grandes pérdidas de la celulosa, ya que, de media, el porcentaje que permanece en el sólido es mayor al 90 % de la celulosa inicial de la madera. El contenido en celulosa en la madera autohidrolizada en las condiciones

inferiores del diseño (AH-3) es del 46,5 % y en las condiciones superiores (AH-8) del 56,1 %.

6.1.2.2. Hemicelulosas

El contenido en hemicelulosas de la madera autohidrolizada se estudia de forma individual en los tres polímeros que la conforman: el xilano, X_{AH} (%), el galactano, Ga_{AH} (%), y el manano, M_{AH} (%). En la Tabla 6.7 se muestran los efectos de la temperatura (T) y el tiempo (t), así como de sus interacciones, sobre el contenido de estos tres polímeros en el sólido autohidrolizado.

Tabla 6.7. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre X_{AH} , Ga_{AH} y M_{AH} .

Efecto	Valor \pm Error		
	Xilano	Galactano	Manano
T	-2,473 \pm 0,041	-1,663 \pm 0,071	-7,346 \pm 0,071
t	-0,910 \pm 0,041	-0,710 \pm 0,071	-2,851 \pm 0,071
T ²	-0,171 \pm 0,049	0,150 \pm 0,084	0,450 \pm 0,084
Tt	-0,200 \pm 0,058	0,000 \pm 0,100	-0,150 \pm 0,100
t ²	0,479 \pm 0,049	0,450 \pm 0,084	0,900 \pm 0,084
Media	2,933 \pm 0,033	2,000 \pm 0,058	5,400 \pm 0,058

El análisis de varianza de estas tres respuestas se recoge en la Tabla 6.8. Se puede observar cómo el xilano y el galactano presentan los mismos efectos significativos (T, t y t²). Sin embargo, en el manano, el polímero correspondiente a la manosa, que es el monómero predominante en las maderas blandas, todos los efectos e interacciones son significativos a excepción de Tt.

Tabla 6.8. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre X_{AH} , Ga_{AH} y M_{AH} .

	Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
Xilano	T	12,229	1	12,229	3668,82	0,0003
	t	1,655	1	1,655	496,44	0,0020
	T ²	0,041	1	0,041	12,36	0,0722
	Tt	0,040	1	0,040	12,00	0,0742
	t ²	0,324	1	0,324	97,24	0,0101
	Falta de ajuste	(0,022)	(3)	(0,007)	(2,20)	(0,3273)
		0,103	5	0,021	6,19	0,1448
	Error puro	0,007	2	0,003		
	Total	14,427	10			
Galactano	T	5,532	1	5,532	553,23	0,0018
	t	1,007	1	1,007	100,71	0,0098
	T ²	0,032	1	0,032	3,18	0,2167
	Tt	0,000	1	0,000	0,00	1,0000
	t ²	0,286	1	0,286	28,59	0,0332
	Falta de ajuste	(0,091)	(3)	(0,030)	(3,02)	(0,2586)
		0,122	5	0,024	2,45	0,3151
	Error puro	0,020	2	0,010		
	Total	6,936	10			
Manano	T	107,924	1	107,924	10792,42	0,0001
	t	16,260	1	16,260	1626,03	0,0006
	T ²	0,286	1	0,286	28,59	0,0332
	Tt	0,023	1	0,023	2,25	0,2724
	t ²	1,144	1	1,144	114,35	0,0086
	Falta de ajuste	(0,405)	(3)	(0,135)	(13,52)	(0,0697)
		0,428	4	0,107	10,70	0,0873
	Error puro	0,020	2	0,010		
	Total	125,829	10			

(): Valores para la falta de ajuste del análisis de varianza inicial

En todos los casos, el valor de P de la falta de ajuste para todos los análisis es mayor a 0,05, lo que indica que la falta de ajuste es no significativa y los modelos obtenidos son adecuados para representar los resultados (Dong y col., 2016). A continuación se exponen los modelos ajustados a funciones cuadráticas con los términos significativos que describen la relación entre las variables estudiadas (temperatura “T” y tiempo “t” de reacción) para el porcentaje en xilano, X_{AH} (%),

galactano, G_{AH} (%), y manano, M_{AH} (%), de la madera autohidrolizada. Además, se muestran los coeficientes de correlación (R^2) y los errores estándar y absoluto. Los coeficientes de correlación indican que los modelos aplicados explican el 99,24 %, 98,41 % y 99,64 % de la variación en las tres respuestas estudiadas.

Hemicelulosas _{AH} (%)	
$X_{AH} (\%) = 15,3308 - 0,0618201T - 0,0504545t + 0,000294118t^2$ $R^2 = 99,24 \%$ Error estándar de la estimación = 0,058 Error medio absoluto = 0,080	[6.3]
$G_{AH} (\%) = 10,6605 - 0,0415795T - 0,038886t + 0,000225492t^2$ $R^2 = 98,41 \%$ Error estándar de la estimación = 0,100 Error medio absoluto = 0,088	[6.4]
$M_{AH} (\%) = 57,5281 - 0,374901T - 0,107522t + 0,00056251T^2 + 0,000500001t^2$ $R^2 = 99,64 \%$ Error estándar de la estimación = 0,100 Error medio absoluto = 1,169	[6.5]

Para demostrar la buena concordancia entre los resultados experimentales y los valores predichos por el modelo, se representan estos datos en la Figura 6.5, donde se comprueba que los puntos se aproximan a la diagonal en todos los casos estudiados.

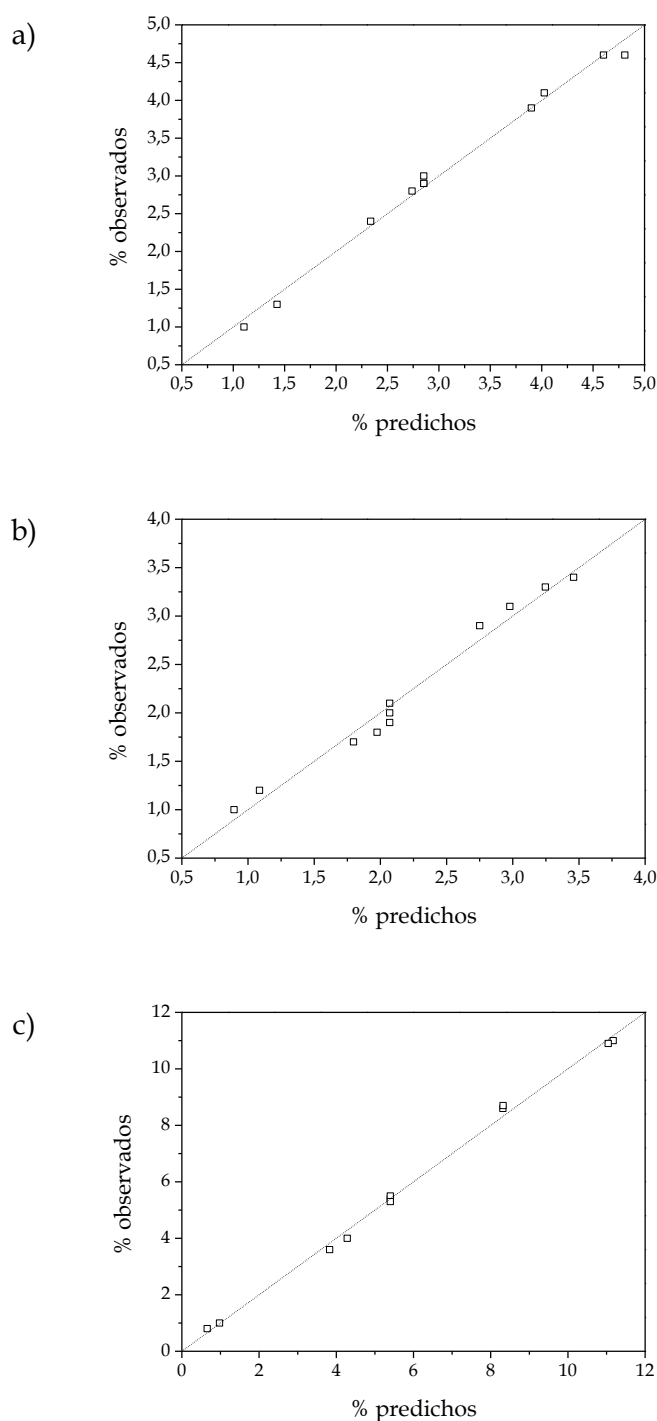


Figura 6.5. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para la hemicelulosa en la madera autohidrolizada: a) X_{AH} (%), b) Ga_{AH} (%) y c) M_{AH} (%).

Los mapas de contorno que representan las ecuaciones [6.3], [6.4] y [6.5] se muestran en la Figura 6.6. A diferencia del mapa de contorno de la celulosa, estas respuestas presentan la curvatura dada por los términos cuadráticos de las ecuaciones.

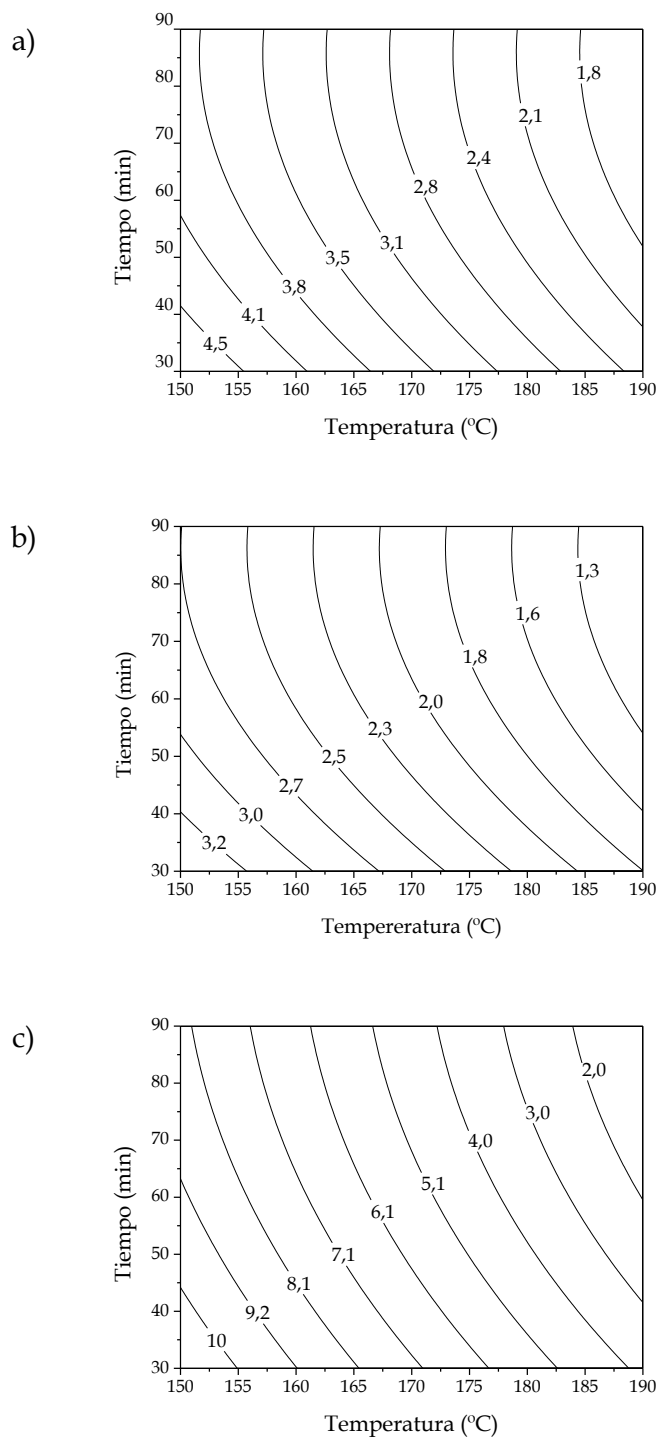


Figura 6.6. Mapa de contorno de la hemicelulosa en la madera autohidrolizada:
a) X_{AH} (%), b) Ga_{AH} (%) y c) M_{AH} (%).

De forma general, el porcentaje de los tres monómeros que permanecen en la madera autohidrolizada, xilosa, galactosa y manosa, disminuye con el incremento de la severidad del tratamiento por la su despolimerización y su liberación hacia la fase líquida (Ruiz y col., 2013; Ertas y col., 2014; Gonçalves y col., 2015). Al igual que ocurría con el contenido en celulosa (C_{AH}), la variable independiente que tiene más influencia en estas respuestas (X_{AH} (%), Ga_{AH} (%) y M_{AH} (%)) es la temperatura.

Durante el pretratamiento hidrotérmico se produce una mayor solubilización de las hemicelulosas que de la celulosa, debido a que es un polímero más amorfo y menos estable, lo que conlleva a una mayor extracción de la fase sólida (Ruiz y col., 2012; Li y col., 2014a).

Los datos de las hemicelulosas que permanecen en la madera autohidrolizada permiten cuantificar los porcentajes de los polímeros iniciales que las componen y que se solubilizan en la fase líquida en las condiciones estudiadas: un 22-87 % del xilano, un 3-79 % del galactano y un 4-95 % del manano. En cuanto al otro azúcar presente en la hemicelulosa de la madera de partida, la arabinosa, no se ha detectado en la caracterización de la madera autohidrolizada. Por ello, se considera que, incluso bajo las condiciones más suaves de tratamiento, es más susceptible a la hidrólisis que otros azúcares y se solubiliza en la fase líquida (Gonzalez-Muñoz y col. 2012). Esta afirmación queda comprobada en el análisis de la fase líquida de los diferentes ensayos del diseño de autohidrólisis que se discute posteriormente (apartado 6.2).

La madera autohidrolizada presenta un porcentaje de hemicelulosas totales comprendido entre 2,9 % en condiciones más severas (AH-6, 198 °C y 60 min) y 18,8 % en las más suaves (AH-5, 150 °C y 30 min), es decir, se extraen entre un 19 y 91 % de las hemicelulosas iniciales de la madera de pino. Silva-Fernandes y col. (2015) obtuvieron esta misma tendencia en residuos de eucalipto, paja de trigo y podas de olivo, partiendo de un serrín con tamaño de partícula menor a 6 mm, llegando a alcanzar entre un 93 y 95 % de solubilización del xilano, el monómero principal de estas materias primas, a la temperatura más severa de pretratamiento (230 °C en condiciones no isoterma). Batalha y col. (2015) obtuvieron una eliminación del 82 % del xilano del bagazo de caña de azúcar inicial al trabajar a 180 °C y 40 min. Ertas y col. (2014) trabajando con condiciones de temperatura de 160-200 °C y de tiempo 10-20 min en

isotermos, también obtuvieron un intervalo de hemicelulosas en el sólido autohidrolizado de 1,3-18,3 %. En las condiciones más severas, supone aproximadamente un 94 % de solubilización de las hemicelulosas iniciales de la paja de trigo de partida. El porcentaje restante se considera que probablemente queda enlazado a la lignina no extraída durante el tratamiento. Por tanto, los valores obtenidos están de acuerdo con los de otros autores que han trabajado con distintos materiales lignocelulósicos.

A la vista de los resultados se ha podido comprobar que el tratamiento de autohidrólisis sobre la madera de *Pinus radiata* principalmente da lugar a la eliminación de hemicelulosas. En el intervalo estudiado, se ha conseguido extraer entre un 19 y 91 % de las hemicelulosas iniciales. Así pues, se ha solubilizado en la fase líquida entre 22-87 % del xilano, 3-79 % del galactano y 4-95 % del manano de la madera de partida.

6.1.2.3. Lignina

La lignina de la madera autohidrolizada se compone por lignina soluble e insoluble o Klason, siendo ésta la más estudiada en la bibliografía de los materiales lignocelulósicos tratados (Romaní y col., 2010; Sun y col., 2014d; Gonçalves y col., 2015). Por este motivo, el análisis de varianza se realiza sobre esta respuesta, LI_{AH} (%). Los efectos de los factores principales y sus interacciones, así como sus errores, se muestran en la Tabla 6.9.

Tabla 6.9. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre LI_{AH} .

Efecto	Valor \pm Error
T	7,273 \pm 0,212
t	2,235 \pm 0,212
T ²	-0,575 \pm 0,252
Tt	-0,100 \pm 0,300
t ²	-0,775 \pm 0,252
Media	33,700 \pm 0,173

El análisis de varianza de la lignina insoluble se muestra en la Tabla 6.10. De nuevo, en rojo se resaltan aquellos efectos que no son significativos y que no se tienen en cuenta para la realización del modelo.

Tabla 6.10. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre LI_{AH} .

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
T	105,805	1	105,805	1175,61	0,0008
t	9,990	1	9,990	111,00	0,0089
T ²	0,467	1	0,467	5,19	0,1505
Tt	0,010	1	0,010	0,11	0,7706
t ²	0,848	1	0,848	9,42	0,0918
Falta de ajuste	(2,270) 3,314	(3) 6	(0,757) 0,552	(8,41) 6,14	(0,1081) 0,1467
Error puro	0,180	2	0,090		
Total	119,289	10			

(): Valores para la falta de ajuste del análisis de varianza inicial

La ecuación [6.6] representa el modelo de ajuste con los términos correspondientes a los efectos significativos (temperatura y tiempo). También, se recogen el coeficiente de correlación R^2 , el error estándar y el error medio absoluto.

Lignina insoluble _{AH} (%)
$LI_{AH} (\%) = 0,0620437 + 0,181836T + 0,0372488t$ [6.6] $R^2 = 97,07 \%$ Error estándar de la estimación = 0,300 Error medio absoluto = 0,442

Como se muestra en la Figura 6.7, todos los puntos se encuentran cercanos a la línea representativa del error cero, quedando demostrada la buena concordancia entre ambos pares de valores.

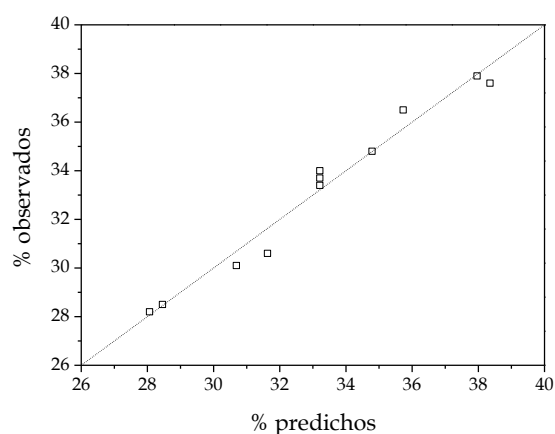


Figura 6.7. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para LI_{AH} (%).

En la Figura 6.8 se muestra el mapa de contorno resultante de aplicar el modelo obtenido para la lignina insoluble mediante la ecuación [6.6].

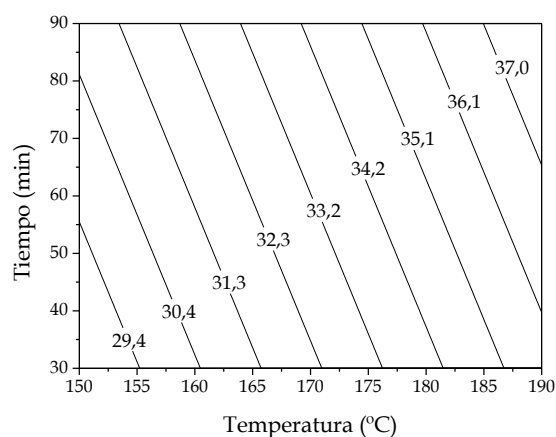


Figura 6.8. Mapa de contorno de LI_{AH} (%).

Se observa un incremento en el porcentaje de la lignina insoluble en la madera autohidrolizada, desde un 26,6 % en el pino original hasta un 37,6 % en las condiciones más severas de tratamiento hidrotérmico ($S_0 = 4,76$). Al igual que ocurría en el caso de la celulosa, este incremento está asociado a la despolimerización y solubilización de las hemicelulosas de la madera de pino. La reducción del porcentaje de la fracción hemicelulósica de la madera da lugar a un incremento en el porcentaje de lignina (Li y col., 2014a; Zakaria y col., 2015).

Este comportamiento también ha sido observado por otros autores al aplicar este tratamiento en otras materias primas. Zakaria y col. (2015) obtuvieron un sólido procedente de la biomasa de palma de aceite que presentaba el doble del porcentaje de lignina insoluble que la biomasa inicial. De esta forma, el contenido inicial de lignina (15,2 %) se incrementaba hasta un 33,7 % en el sólido tras el tratamiento, al someterlo a una autohidrólisis a 230 °C ($S_0 = 4,24$), justificando este hecho a la migración y reposición de la lignina en la superficie del sólido. Li y col. (2014a) encontraron un incremento del porcentaje de esta lignina desde un 27,5 % hasta un 40,6 %, al tratar una especie de bambú (*Phyllostachys acuta*) bajo un proceso no isoterma de autohidrólisis alcanzando una temperatura máxima de 240 °C ($S_0 = 4,82$). Sun y col. (2014d) también observaron un aumento desde 14 % hasta 41,7 % en la lignina Klason en residuos de mazorcas de maíz con una temperatura de 230 °C ($S_0 = 3,91$). En el caso de materiales lignocelulósicos más próximos al estudiado en este trabajo, madera, también se ha confirmado el incremento de este porcentaje. Por ejemplo, Meng y col. (2015) obtuvieron un aumento aproximadamente desde el 23 al 32 %, para una madera dura de álamo (*Populus*) en el intervalo de temperaturas 120-160 °C y tiempos de 10 a 60 min.

A pesar del incremento en porcentaje de lignina insoluble en la madera autohidrolizada de *Pinus radiata*, desde el punto de vista másico, estos valores representan un pequeño intervalo comprendido entre 24,3 y 26,5 g/100 g de madera de pino. Por tanto, existe una pequeña eliminación de la lignina procedente de las reacciones de solubilización de la misma. En todos los ensayos, el porcentaje de la lignina insoluble inicial que queda en la madera es superior al 91 %. La pequeña fracción de pérdida ocurre por la rotura homolítica de los enlaces α -O-4 y β -O-4 de la lignina que da lugar a pequeños fragmentos que se solubilizan en la fase líquida (Batalha y col., 2015). Estos altos porcentajes de lignina inicial que permanecen en la fase sólida están en concordancia con los obtenidos por Ko y col. (2015). Estos autores al trabajar con una mezcla de maderas duras a temperaturas de 180-220 °C y tiempos 5-15 min, conservaban en el sólido entre 81 y 92 % de la lignina inicial.

En cuanto a la lignina soluble, el porcentaje en la madera autohidrolizada se reduce con el incremento de las condiciones de temperatura y tiempo, pasando de

4,6 % a 3,2 %. Así pues, la lignina soluble tras la autohidrólisis se encuentra entre 2,1 y 4,2 g/100 g de madera de pino en las condiciones más severas (AH-6, 198 °C y 60 min) y más suaves (AH-5, 142 C y 60 min), respectivamente. Esta tendencia, inversa a la que ocurre a la lignina insoluble, también ha sido observada por Ko y col. (2015).

En la Figura 6.9 se muestran las diferentes tonalidades de las fases sólidas obtenidas en los ensayos del diseño de autohidrólisis, numerándose de acuerdo al mismo.



Figura 6.9. Tonalidades obtenidas en la fase sólida del diseño de autohidrólisis.

Se observa cómo las tonalidades se van oscureciendo a medida que la intensidad del tratamiento se va incrementando. En las condiciones más suaves, la tonalidad es semejante al color de la madera original: AH-3 (150 °C y 30 min) y AH-5 (142 °C y 60 min), mientras que las más oscuras se relacionan con las condiciones más severas de tratamiento: AH-6 (198 °C y 60 min) y AH-8 (190 °C y 90 min). Estas tonalidades más oscuras se pueden asociar al mayor contenido en lignina en dichas muestras, ya que presentan porcentajes de lignina insoluble que alcanzan hasta un 37% (AH-6 y AH-8) frente a las muestras de tonalidades más claras con un 28 % (AH-3 y AH-5).

A la vista de los resultados, se puede confirmar que en el tratamiento de autohidrólisis se pierde poca lignina de la madera de pino. Como resultado, la lignina que permanece en los sólidos tratados, con respecto a la inicial, es superior al 90 %. El contenido en lignina en la madera autohidrolizada se encuentra entre un 28,5 % en las condiciones inferiores de temperatura y tiempo del diseño (AH-3) y un 37,6 % en las condiciones superiores (AH-6).

6.1.3. Estabilidad térmica

El análisis termogravimétrico de la madera autohidrolizada de los diferentes ensayos del diseño de autohidrólisis permite el estudio de la estabilidad térmica de las mismas. En la Tabla 6.11 se recogen los parámetros de degradación térmica considerados en este estudio, realizado bajo condiciones no isotermas y atmósfera inerte de N₂, la temperatura de degradación al 10 % ($T_{10\%-\text{AH}}$), la temperatura de degradación máxima ($T_{\text{max-AH}}$) y las cenizas a 800 °C.

Tabla 6.11. Parámetros de degradación térmica de la madera autohidrolizada.

Experimento	$T_{10\%-\text{AH}}$ (°C)	$T_{\text{max-AH}}$ (°C)	Cenizas a 800 °C (%)
AH-1	306	361	22,9
AH-2	315	361	24,6
AH-3	297	357	20,2
AH-4	304	359	20,6
AH-5	299	359	21,9
AH-6	323	359	23,2
AH-7	317	359	22,1
AH-8	324	359	23,3
AH-9	319	359	22,8
AH-10	312	359	22,5
AH-11	314	361	22,2

La temperatura de degradación al 10 % de las muestras de madera autohidrolizada varía entre 297 y 323 °C. Sin embargo, los valores de la temperatura donde se alcanza la velocidad máxima de degradación son muy similares y se encuentra en torno a 360 °C. Con respecto al porcentaje de cenizas, éste varía entre un 20,2 y 24,6 % para todas las muestras del diseño. Estos resultados están acorde a las obtenidos por otros autores para diferentes materiales lignocelulósicos como residuos agrícolas, maderas o cañamo (Chen y col., 2010; Slopicka y col., 2012; Abraham y col., 2016; Michelin y Texeira, 2016).

La temperatura de degradación al 10 % se considera un parámetro que se atribuye a la estructura modificada y a la rotura de las hemicelulosas en la biomasa (Biswas y col., 2011), por lo que el análisis ANOVA se realiza para este parámetro. En la Tabla 6.12 se recogen los efectos de las variables independientes (temperatura y tiempo de

pretratamiento) sobre la temperatura de degradación al 10 % ($T_{10\% \text{-AH}}$). Los efectos estimados incluyen los factores principales, las interacciones y los de segundo orden.

Tabla 6.12. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre $T_{10\% \text{-AH}}$.

Efecto	Valor \pm Error
T	18,985 \pm 1,080
t	6,889 \pm 1,080
T^2	-2,792 \pm 1,286
Tt	-1,000 \pm 1,528
t^2	-2,292 \pm 1,286
Media	313,667 \pm 0,882

El análisis de varianza realizado sobre la temperatura de degradación al 10 % de la madera autohidrolizada de los ensayos del diseño de experimentos del pretratamiento de autohidrólisis se muestra en la Tabla 6.13. Tras aplicar los criterios de exclusión de efectos no significativos ($F > 18,51$ y $P < 0,05$), la temperatura y el tiempo resultan ser los efectos significativos.

Tabla 6.13. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre $T_{10\% \text{-AH}}$.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
T	720,883	1	720,883	308,95	0,0032
t	94,919	1	94,919	40,68	0,0237
T^2	11,003	1	11,003	4,72	0,1620
Tt	1,000	1	1,000	0,43	0,5799
t^2	7,414	1	7,414	3,18	0,2166
Falta de ajuste	(9,823) 25,168	(3) 6	(3,274) 4,195	(1,40) 1,80	(0,4418) 0,3997
Error puro	4,667	2	2,333		
Total	845,636	10			

(): Valores para la falta de ajuste del análisis de varianza inicial

A partir de la tabla de ANOVA, se lleva a cabo el ajuste a un modelo teniendo en cuenta los efectos significativos (T y t) que viene dado por la ecuación [6.7].

$T_{10\% \text{-AH}} (^{\circ}\text{C})$
$T_{10\% \text{-AH}} (^{\circ}\text{C}) = 224,241 + 0,474635T + 0,114818t \quad [6.7]$
$R^2 = 96,47 \%$
Error estándar de la estimación = 1,527
Error medio absoluto = 1,381

Los valores predichos de temperatura de degradación ($T_{10\% \text{-AH}}$) frente a los valores experimentales se representan en la Figura 6.10 con un coeficiente de correlación del 95,5%.

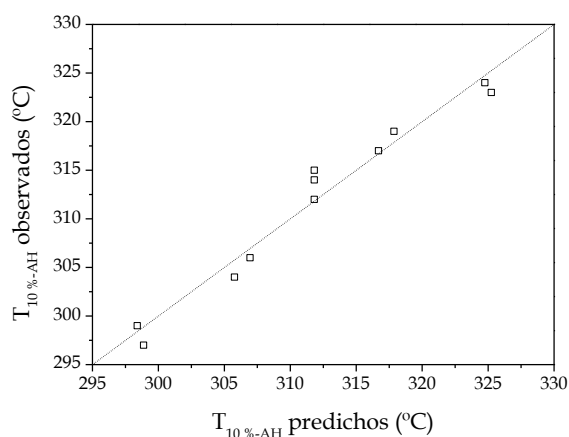


Figura 6.10. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para $T_{10\% \text{-AH}} (^{\circ}\text{C})$.

En la Figura 6.11 se representa el mapa de contorno de la temperatura estudiada ($T_{10\% \text{-AH}}$). Se comprueba que la variable más influyente en el tratamiento de autohidrólisis es la temperatura frente al tiempo de reacción.

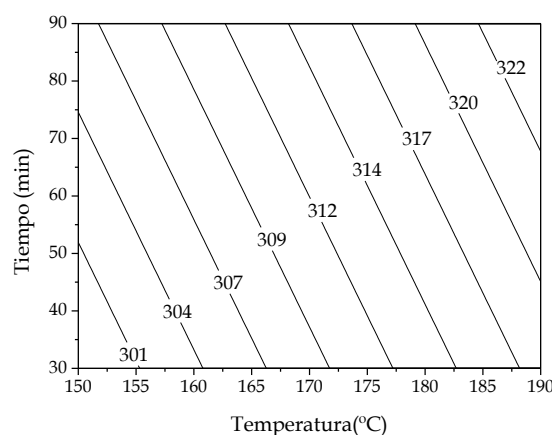


Figura 6.11. Mapa de contorno de $T_{10\% \text{-AH}}$ ($^{\circ}\text{C}$).

El incremento de la severidad del tratamiento, tanto en tiempo como en temperatura, se traduce en el aumento de la temperatura de degradación al 10 % de la madera autohidrolizada. Este incremento en la temperatura de degradación y, por tanto, de estabilidad térmica de los sólidos obtenidos, se debe al cambio de la composición de la madera tratada al haber liberado las hemicelulosas que presentan una estructura más amorfa y fácilmente hidrolizable (Michelin y Texeira, 2016). Este mismo comportamiento también ha sido observado en otro tipo de materias primas como la madera de *Tamarix ramosissima* y los residuos agrícolas como la paja de trigo, que tras ser sometidos a este tratamiento hidrotérmico, incrementaban su estabilidad térmica (Xiao y col., 2011; Michelin y Texeira, 2016).

A continuación se analizan las curvas de TGA y sus derivadas, así como la relación existente entre la $T_{10\%}$ de las muestras y el contenido en hemicelulosas de las mismas. En la Figura 6.12 se muestran los termogramas de tres maderas autohidrolizadas del diseño que han sido obtenidas a condiciones suaves (AH-3, 150°C y 30 min), a condiciones intermedias (AH-11, 170°C y 60 min) y a condiciones severas (AH-8, 190°C y 90 min). En dichas curvas, se señalan la temperatura de degradación al 10 % y las cenizas a 800°C . También se representan las derivadas de las curvas de estas muestras (DTG), indicando los polímeros que se degradan.

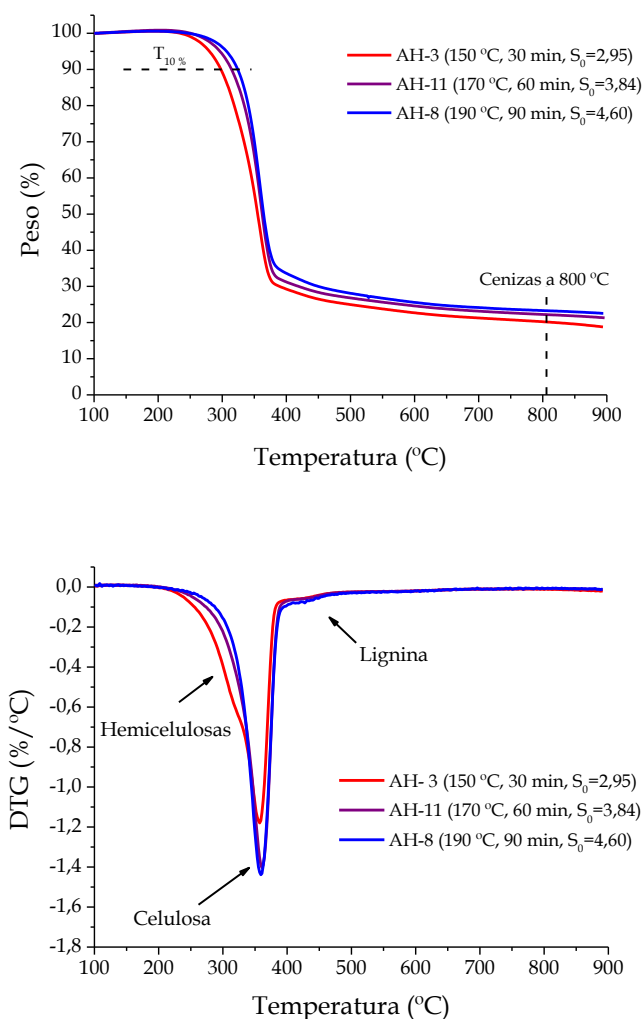


Figura 6.12. Curvas de TGA y DTG de la fase sólida de los ensayos AH-3, AH-8 y AH-11 del diseño de autohidrólisis.

De forma general, la descomposición térmica de la biomasa se produce en tres etapas que corresponden a sus tres principales compuestos. Al principio tiene lugar la degradación de las hemicelulosas y, de forma consecutiva, la de la celulosa que se produce en el intervalo de temperatura entre 200 y 380 °C. Específicamente la primera de ellas ocurre entre los 200 y 380 °C y la segunda entre 250 y 380 °C (Slopiecka y col., 2012). La degradación de la lignina presenta un intervalo de temperaturas más amplio comprendido entre los 180 y 500 °C (Barneto y col., 2009). La descomposición térmica que se produce en el intervalo de temperatura entre 200 y 500 °C, se denomina etapa de pirólisis activa. A partir de los 500 °C, se produce la pérdida de masa en menor proporción que se corresponde a la etapa de pirólisis pasiva (Gašparovič y col., 2010; Slopiecka y col., 2012).

Los principales productos generados en la pirólisis de la biomasa son CO_2 , CH_4 , CO , H_2 , agua y algunos compuestos orgánicos como aldehídos, alcanos y éteres. De forma general, la hemicelulosa contribuye a la liberación de CO_2 , debido a su mayor contenido en grupos carboxílicos, la celulosa da lugar principalmente a CO por su contenido en grupos carbonilo y la lignina a H_2 y CH_4 , debido su contenido en anillos aromáticos y sus grupos funcionales OCH_3 (Yang y col., 2007).

Con respecto a la derivada de las curvas de TGA, el pico más acusado corresponde a la degradación de la celulosa, encontrándose en torno a los 360°C (Chen y col., 2010). Este pico es más simétrico y estrecho en las muestras procedentes de las condiciones más severas de tratamiento (AH-8, 190°C y 90 min), mientras que es más ancho y asimétrico para las condiciones más suaves de tratamiento (AH-3, 150°C y 30 min). Esta diferencia se debe, principalmente, a la presencia de hemicelulosas que producen el solapamiento de los picos de la degradación de las hemicelulosas y la celulosa (Chen y Kuo, 2010; Biswas y col., 2011). El pico relacionado con la degradación de las hemicelulosas se presenta en torno a los 320°C (Chen y col., 2010). Además, próximo a los 425°C se presenta otro pico que se asocia a la degradación de la lignina, ya que su intervalo de temperaturas de descomposición térmica es más amplio y se produce tanto en la etapa de pirólisis activa como pasiva (Barneto y col., 2009; Gašparovič y col., 2010; Słopiecka y col., 2012).

En todas las muestras del diseño de autohidrólisis, el valor de la T_{max} es muy parecido, encontrándose aproximadamente en 360°C . Dicha posición se ha relacionado con las características estructurales de la celulosa, como son el índice de cristalinidad y grado de polimerización. Park y col. (2013) justificaban esta similitud en la posición del pico con que estas propiedades estructurales de la celulosa no se alteraban tras el tratamiento de torrefacción en una madera blanda.

En este estudio del tratamiento de autohidrólisis, la pérdida de hemicelulosas da como resultado que el contenido en hemicelulosas en la madera autohidrolizada se encuentre entre 2,9 y 18,8 %. Con el objetivo de relacionar $T_{10\%}$ de las muestras de la madera autohidrolizada con el contenido de hemicelulosas de las mismas, se representan ambos parámetros en la Figura 6.13.

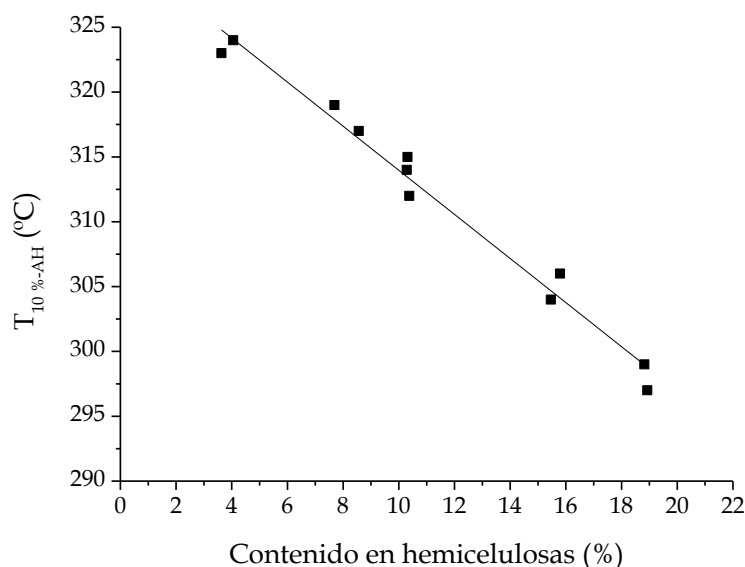


Figura 6.13. $T_{10\% \text{-AH}}$ (°C) frente al contenido en hemicelulosas (%) en la madera autohidrolizada.

Se observa que existe una relación lineal entre la temperatura de degradación al 10 % y el contenido en hemicelulosas de la madera autohidrolizada. De este modo, se puede afirmar que este parámetro aporta información sobre la eliminación de los componentes amorfos durante el tratamiento de autohidrólisis, en este caso, de la extracción de las hemicelulosas. El incremento de la $T_{10\% \text{-AH}}$ indica un aumento en la estabilidad térmica de la madera autohidrolizada, debido a que se incrementa la proporción de componentes cristalinos, la celulosa, que aportan mayor estabilidad térmica.

6.1.4. Grupos funcionales

La fase sólida obtenida en los diferentes ensayos del diseño de experimentos de autohidrólisis se caracteriza mediante espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR). En la Figura 6.14 se muestran los espectros de las tres muestras de los ensayos correspondientes a las condiciones inferiores (AH-3), superiores (AH-8) y centrales (AH-11) del intervalo estudiado en el diseño de experimentos. Se identifican con el número de experimento y se ordenan según el factor de severidad (S_0) aplicado en el tratamiento. El valor del factor de severidad se calcula empleando la ecuación [3.1] que se recoge en el apartado 3.6. Además, se incluye el espectro de la madera de pino como referencia.

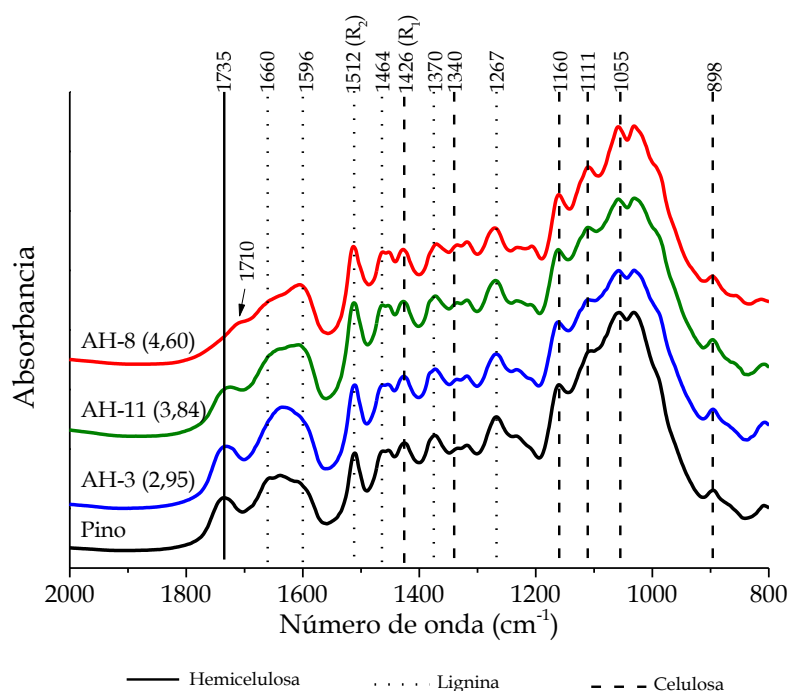


Figura 6.14. Espectros de FTIR de las fases sólidas del diseño (AH-3, AH-8 y AH-11) y madera de pino.

El cambio más significativo de las bandas de los espectros de la Figura 6.14 es el producido en la banda de 1735 cm^{-1} que está relacionada con las hemicelulosas. Este número de onda se corresponde con la vibración del estiramiento del $\text{C}=\text{O}$, debida a los enlaces carbonilo de los grupos acetilo de los xilanos (Moniz y col., 2013). A medida que se incrementa la severidad del pretratamiento, la banda se suaviza hasta no ser apreciable. Este hecho se relaciona con la hidrólisis de las hemicelulosas y, por tanto, con su eliminación de la madera de pino (Adel y col., 2010; Park y col., 2013).

Otro de los cambios importantes que se encuentra es el incremento en la absorción de la banda de la lignina a 1512 cm^{-1} , correspondiente a la vibración del anillo aromático. Este aumento se debe al mayor porcentaje de lignina en la madera autohidrolizada por el tratamiento de autohidrólisis que se produce al eliminar las hemicelulosas (Sun y col., 2014c).

A fin de comprobar la reducción de intensidad de la banda de 1735 cm^{-1} , así como el incremento de la banda de 1512 cm^{-1} , se realiza un análisis semicuantitativo de las absorbancias de estas bandas de los espectros. Para ello, se toma como banda de referencia la correspondiente a 1426 cm^{-1} , como plantearon Sun y col. (2014c) al realizar

el estudio de los cambios relativos producidos en muestras de madera de álamo sometidas a un tratamiento con ácido diluido. En la Tabla 6.14 se muestran los resultados del análisis semicuantitativo de dichas bandas y la de la madera de pino.

Tabla 6.14. Análisis semicuantitativo FTIR. Banda referencia $R_1 = 1426 \text{ cm}^{-1}$.

Muestra	S_0	A_{1735}/A_{1426}	A_{1512}/A_{1426}
Pino	-	0,4906	0,8954
AH-3 (150°C y 30 min)	2,95	0,4686	0,9284
AH-11 (170°C y 60 min)	3,84	0,3032	0,9784
AH-8 (190°C y 90 min)	4,60	0,2419	1,0288

La relación de bandas A_{1735}/A_{1426} se reduce con el incremento del factor de severidad, pasando de un valor de 0,4906 para la madera de pino hasta 0,2419 para la madera autohidrolizada obtenida bajo condiciones severas. La relación A_{1512}/A_{1426} se incrementa con la severidad del tratamiento, aumentando desde 0,8954 en la madera sin tratar hasta 1,0288 para la madera autohidrolizada del experimento AH-8 (190 °C y 90 min). Este análisis semicuantitativo confirma los cambios que se producen en las intensidades de las bandas de la madera autohidrolizada y están de acuerdo con el contenido en carbohidratos y lignina cuantificado previamente en el apartado 6.1.2. Otros autores han observado también estos cambios de bandas al emplear un tratamiento de torrefacción en una madera blanda y un tratamiento con ácido diluido por bagazo de caña de azúcar, justificado por la eliminación de las hemicelulosas producido durante el mismo (Park y col., 2013; Brienzo y col., 2017).

Con respecto a las bandas de la lignina, algunas presentan también cambio de intensidad con la severidad de tratamiento. Estas bandas son las correspondientes al estiramiento del enlace C=O de los anillos guayacilo, 1267 cm^{-1} , al estiramiento del enlace C-H alifático en los grupos CH_3 , 1370 cm^{-1} y al estiramiento del enlace C=O conjugado de los grupos carbonilos, 1660 cm^{-1} . En este caso, para confirmar la variación de dichas bandas, el análisis semicuantitativo se realiza tomando como banda de referencia la correspondiente a la vibración del esqueleto aromático de la lignina, 1512 cm^{-1} . Esta banda de lignina se selecciona en base al estudio que realizaron Adel y col. (2010) sobre el tratamiento hidrotérmico y con ácido sobre cáscaras de arroz. En la Tabla 6.15 se muestran los resultados para las tres muestras de madera autohidrolizada del diseño seleccionadas.

Tabla 6.15. Análisis semicuantitativo FTIR. Banda referencia $R_2 = 1512\text{ cm}^{-1}$.

Muestra	S_0	A_{1660}/A_{1512}	A_{1370}/A_{1512}	A_{1267}/A_{1512}
Pino	-	0,7426	1,1946	1,3879
AH-3 (150°C y 30 min)	2,95	0,7017	1,1339	1,2591
AH-11 (170°C y 60 min)	3,84	0,5621	1,0513	1,1872
AH-8 (190°C y 90 min)	4,60	0,5297	1,0094	1,1539

En todos los casos, la relación de las bandas estudiadas disminuye su valor con el incremento de la severidad de tratamiento. Esta reducción de la intensidad de banda relacionada con los grupos carbonilos (1660 cm^{-1}) y con los enlaces $C=O$ de los anillos guayacilo (1267 cm^{-1}) se asocia a la rotura de los enlaces éter de la lignina (Wang y col., 2016). Destacar que bajo las condiciones más severas de autohidrólisis (AH-8, 190°C y 90 min) aparece la banda a 1710 cm^{-1} que se relaciona con la formación de la β -cetona, también denominada “cetona de Hibbert”. Tras la eliminación de agua de la posición bencílica de la lignina se genera un carbocatión, que mediante la pérdida de un protón, da lugar a la creación de un éter enólico. Éste se hidroliza fácilmente dando lugar a la rotura del enlace β -O-4 y formando un grupo cetónico en la posición del carbono β , es decir, la β -cetona (El Hage y col., 2010; Chen y col., 2016; Hosseinaei y col., 2016; Wang y col., 2016). Por tanto, la aparición de la banda de 1710 cm^{-1} en el espectro, asociada a esta β -cetona, confirma que durante la autohidrólisis tiene lugar la rotura de los enlaces de la lignina.

Los resultados del análisis de FTIR de las maderas autohidrolizadas confirman los cambios en el contenido de lignina y hemicelulosa que se producen durante el tratamiento de autohidrólisis de la madera discutidos previamente en el apartado 6.1.2. Además, se observa que se producen reacciones de despolimerización de la lignina, ya que se confirma la rotura de los los enlaces β -O-4 de la lignina por la reducción de la intensidad de ciertas bandas características, así como la aparición de una banda asociada a la formación de la cetona de Hibbert generada en las condiciones más severas de autohidrólisis.

6.2. Caracterización de la fase líquida de la autohidrólisis

En el presente epígrafe se recogen los resultados del segundo bloque del tratamiento de autohidrólisis, es decir, la caracterización de la fase líquida obtenida tras el diseño de experimentos. La respuesta evaluada será el pH de la fase líquida resultante. La concentración de oligosacáridos, monosacáridos y productos de degradación se evalúa mediante el factor de severidad del tratamiento, determinado mediante la ecuación [3.1].

6.2.1. Determinación del pH

La variable dependiente en la fase líquida resultante del tratamiento de autohidrólisis de la madera de pino es la medida del pH (pH_{AH}). En la Tabla 6.16 se muestran los valores del pH de los once ensayos del diseño de experimentos.

Tabla 6.16. Valores del pH de la fase líquida de la autohidrólisis.

Experimento	pH_{AH}
AH-1	3,71
AH-2	3,57
AH-3	3,98
AH-4	3,64
AH-5	3,96
AH-6	3,04
AH-7	3,36
AH-8	3,12
AH-9	3,40
AH-10	3,49
AH-11	3,55

En la Tabla 6.17 se recogen los efectos de la temperatura (T) y el tiempo (t) del pretratamiento sobre los valores de pH, incluyendo los efectos principales y de sus interacciones. También se muestran los errores asociados a los mismos, tratándose de errores estándar basados en el error puro con 2 grados de libertad.

Tabla 6.17. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre pH_{AH}.

Efecto	Valor ± Error
T	3,537 ± 0,024
t	-0,600 ± 0,029
T ²	-0,279 ± 0,029
Tt	-0,028 ± 0,035
t ²	0,030 ± 0,042
Media	0,007 ± 0,035

En la Tabla 6.18 se muestra el análisis de varianza de los efectos, resaltando en color rojo aquellos efectos que son no significativos, ya que presentan una *F* menor a 18,51 y una *P* mayor a 0,05. Se observa que sólo los efectos principales (temperatura y tiempo) son significativos. La nueva falta de ajuste al eliminar los efectos significativos tiene un valor de 0,5911, mayor a 0,05, lo que significa que el ajuste del modelo es correcto y representa adecuadamente los resultados.

Tabla 6.18. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre pH_{AH}.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	<i>F</i>	<i>P</i>
T	0,721	1	0,721	415,76	0,0024
t	0,155	1	0,155	89,65	0,0110
T ²	0,001	1	0,001	0,63	0,5092
Tt	0,001	1	0,001	0,52	0,5460
t ²	0,000	1	0,000	0,04	0,8585
Falta de ajuste	(0,008) 0,010	(3) 6	(0,003) 0,002	(1,47) 0,96	(0,4302) 0,5911
Error puro	0,003	2	0,002		
Total	0,889	10			

(): Valores para la falta de ajuste del análisis de varianza inicial

A continuación, se obtiene el modelo tras el ajuste de los resultados experimentales, junto con el coeficiente de correlación *R*², el error estándar y el medio absoluto.

pH_{AH}
$\text{pH}_{\text{AH}} = 6,35899 - 0,0150068T - 0,00464574t$ [6.8]
$R^2 = 98,49 \%$
Error estándar de la estimación = 0,042
Error medio absoluto = 0,031

Para comprobar la bondad del ajuste del modelo, se representan los valores experimentales del pH frente a los valores de pH predichos por el modelo (Figura 6.15). Los puntos representados se encuentran muy próximos a la diagonal (error cero).

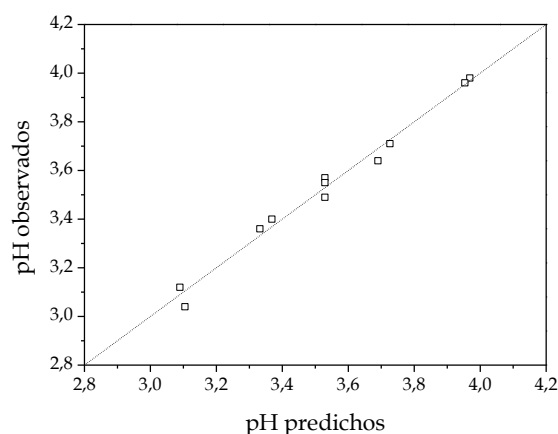


Figura 6.15. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para pH_{AH} .

El mapa de contorno obtenido mediante la ecuación [6.8] se muestra en la Figura 6.16, donde las isolíneas representan las combinaciones de temperatura y tiempo que dan lugar a un valor determinado de pH.

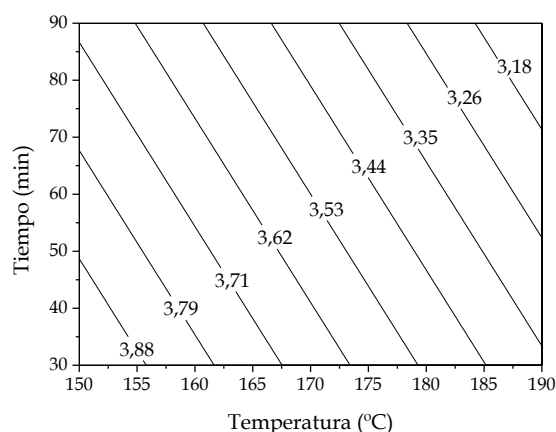


Figura 6.16. Mapa de contorno de pH_{AH}.

Los valores de pH de las fases líquidas del pretratamiento de autohidrólisis se encuentran bajo las condiciones estudiadas en el intervalo entre 3,04 y 3,98. El pH inicial del medio de reacción es de 5,5, el cual corresponde al agua desionizada usada como disolvente y disminuye de forma lineal al incrementar la temperatura y el tiempo de pretratamiento. Esta reducción de pH se debe a la hidrólisis de los grupos acetilo de la hemicelulosa que dan lugar a la formación del ácido acético (Li y col., 2014a; Zakaria y col., 2015). A su vez, los iones hidronio, generados por la reacción de autoionización del agua y de la ionización de los ácidos como el ácido acético, también contribuyen a dichos valores de pH ya que catalizan las reacciones de autohidrólisis (Gírio y col., 2010; Ertas y col., 2014; Batalha y col., 2015). Además, en las condiciones más severas, la generación de productos de degradación como ácidos levulínico y fórmico también favorecen estos pH más bajos. Varios autores obtuvieron valores similares de pH al analizar las fases líquidas hidrolizadas procedentes de mezclas de maderas blandas sometidas a 150-180 °C y 1-2 h de tratamiento y residuos agroindustriales como paja de trigo o residuos de coco tratados a 160-200 °C y 10-50 min (Pu y col., 2013; Ertas y col., 2014; Gonçalves y col., 2015).

A fin de comprobar el efecto autocatalítico de este pretratamiento, se representa la cantidad de madera autohidrolizada obtenida en cada ensayo (ST_{AH}) frente al valor de pH de la fase líquida correspondiente (pH_{AH}), indicándose el número del ensayo dentro del diseño de experimentos (Figura 6.17).

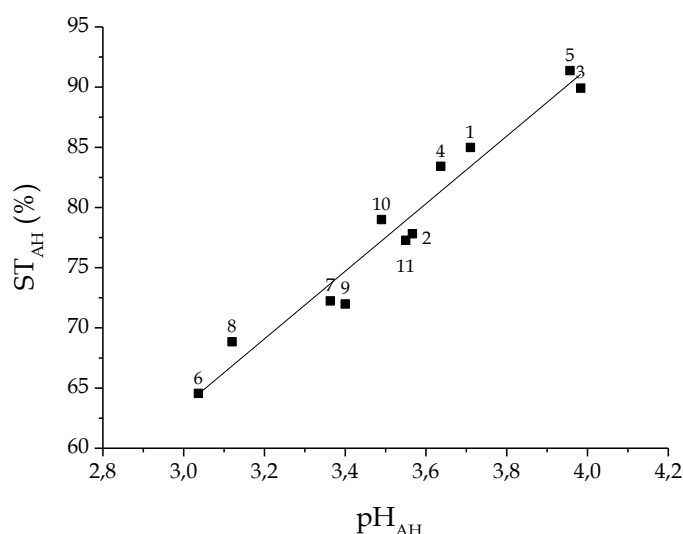


Figura 6.17. Relación entre ST_{AH} (%) y pH_{AH}.

Existe una relación lineal entre los sólidos obtenidos tras el tratamiento de autohidrólisis (ST_{AH}) y el pH final de la fase líquida. Durante el tratamiento hidrotérmico, los grupos acetilo de la hemicelulosa se hidrolizan y se liberan a la fase líquida, dando lugar al ácido acético. Los iones hidronio procedentes de este ácido y de la reacción de autoionización del agua catalizan las reacciones de hidrólisis de la hemicelulosas de la materia de partida. Una vez hidrolizadas y despolimerizadas, las hemicelulosas se solubilizan como oligómeros y azúcares en la fase líquida. Debido a reacciones secundarias en la fase líquida, los azúcares se pueden degradar formando ácidos, causando así la reducción del pH. A su vez, con el incremento de la severidad de tratamiento, se favorece la hidrólisis de las hemicelulosas, lo que supone una bajada del pH y una menor cantidad de sólidos obtenidos tras la autohidrólisis (Lee y col., 2009b; Ertas y col., 2014; Batalha y col., 2015).

6.2.2. Composición

En función de las condiciones aplicadas en la autohidrólisis, las hemicelulosas extraídas de la madera original se presentarán en la fase líquida en forma de oligosacáridos, monosacáridos y/o productos de degradación. A continuación, se detalla la concentración de estos compuestos en cada uno de los once ensayos que conforman el diseño de experimentos.

6.2.2.1. Oligosacáridos

En la Tabla 6.19 se muestra la concentración de los oligosacáridos de los distintos azúcares en las fases líquidas obtenidas en los diferentes ensayos del diseño de autohidrólisis, divididos en función del azúcar monomérico que lo compone: arabinooligosacáridos (AO), glucooligosacáridos (GIO), galactooligosacáridos (GaO), mananoligosacáridos (MaO) y xilooligosacáridos (XO).

Tabla 6.19. Concentración de los oligosacáridos en la fase líquida de autohidrólisis (g/L).

Experimento	AO	GIO	GaO	MO	XO	Totales
AH-1	1,02	1,34	1,30	5,71	1,45	10,82
AH-2	0,49	1,72	1,32	8,27	1,02	12,82
AH-3	0,90	0,58	0,75	1,93	0,60	4,76
AH-4	0,64	1,13	1,14	4,64	1,22	8,78
AH-5	0,85	0,53	0,70	1,72	0,56	4,37
AH-6	0,65	0,56	0,19	0,43	-	1,83
AH-7	1,60	1,90	1,13	8,08	-	12,70
AH-8	0,92	2,11	0,79	0,37	0,20	4,39
AH-9	1,24	1,32	0,71	8,35	-	11,62
AH-10	1,18	1,82	1,10	7,71	0,68	12,50
AH-11	1,17	1,67	1,58	8,56	1,01	13,98

-: no detectado

En la Figura 6.18 se muestra la concentración total de oligosacáridos a fin de conocer la tendencia que presentan estos compuestos en la fase líquida de la autohidrólisis frente al factor de severidad (S_0) de cada experimento.

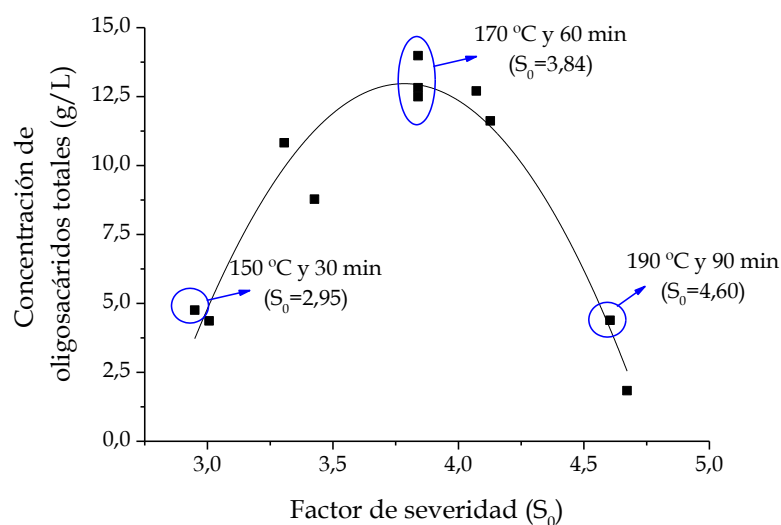


Figura 6.18. Concentración de oligosacáridos totales (g/L) frente al factor de severidad (S_0) del tratamiento de autohidrólisis.

La máxima concentración de oligosacáridos se presenta para un factor de severidad $S_0 = 3,84$ (170°C y 60 min), alcanzando una concentración de 12,7 g/L de oligosacáridos totales, de los cuales, los más abundantes son los procedentes de la manosa (mananooligosacáridos). Estos datos de concentración de oligosacáridos están en concordancia con los obtenidos por otros autores, operando bajo las mismas condiciones de relación líquido/sólido de 10/1 (volumen/peso). Buruiana y col. (2014) alcanzaron un máximo de extracción de su compuesto principal, xilooligosacáridos, correspondiendo a una concentración de 12 g/L al trabajar con rastrojos de maíz con un factor de severidad $S_0 = 4,07$. Moniz y col. (2013) consiguieron una concentración de 13 g/L de xilooligosacáridos, con un factor de severidad de $S_0 = 3,75$ para la paja de maíz. Gonçalves y col. (2015) obtuvieron entre 11 y 16 g/L de este tipo de oligosacáridos para un intervalo de factor de severidad comprendido entre 4,05 y 4,64 para cáscaras de coco.

Tras alcanzar el máximo de concentración de los oligosacáridos, con el incremento del factor de severidad, se produce una disminución en dicha concentración. Ello explica el porqué, una vez que los oligosacáridos se encuentran solubilizados en la fase líquida, se despolimerizan a sus azúcares monoméricos. E incluso, bajo condiciones más severas, estos monómeros se deshidratan dando lugar a furanos (furfural e hidroximetilfurfural). Este aumento de azúcares monoméricos y

productos de degradación en la fase líquida, como consecuencia de la sacarificación de los oligosacáridos, se detalla en los apartados 6.2.2.2 y 6.2.2.3.

Las condiciones más favorables para obtener un fase líquida rica en oligosacáridos corresponde con las condiciones intermedias de tratamiento estudiadas ($S_0 = 3,84$, 170°C y 60 min). Bajo dichas condiciones, se alcanza la máxima concentración de estos compuestos en el medio ($12,7 \text{ g/L}$), lo supone que se extraiga alrededor del 50 % de la hemicelulosa inicial de la madera de pino en forma de oligosacáridos.

6.2.2.2. Monosacáridos

Además de oligosacáridos, la fase líquida presenta azúcares monoméricos procedentes de la hidrólisis de las hemicelulosas de la madera: arabinosa (A), glucosa (Gl), galactosa (Ga), manosa (M) y xilosa (X). La concentración de estos azúcares se presenta en la Tabla 6.20.

Tabla 6.20. Concentración de los monosacáridos en la fase líquida de autohidrólisis (g/L).

Experimento	A	Gl	Ga	M	X	Totales
AH-1	1,18	0,15	0,27	0,03	0,26	1,89
AH-2	1,43	0,81	1,00	0,43	1,66	5,34
AH-3	0,90	-	-	-	-	0,90
AH-4	1,26	0,16	0,32	0,06	0,32	2,11
AH-5	0,92	-	-	-	-	0,92
AH-6	0,25	2,31	1,08	4,96	1,35	9,96
AH-7	1,32	0,98	1,27	1,13	3,48	8,18
AH-8	0,38	2,36	1,20	4,67	1,70	10,30
AH-9	1,22	1,79	1,55	1,75	3,51	9,81
AH-10	1,32	0,89	0,89	0,44	1,88	5,42
AH-11	1,32	0,88	0,88	0,49	1,90	5,47

-: no detectado

En línea con los resultados obtenidos de la composición de la madera autohidrolizada, la arabinosa es el único azúcar detectado en los experimentos realizados en las condiciones más suaves, AH-3 ($S_0 = 2,95$, 150°C y 30 min) y AH-5 ($S_0 = 3,01$, 142°C y 60 min), con un valor medio de $0,91 \text{ g/L}$. Su concentración máxima es de $1,32 \text{ g/L}$, en el intervalo del factor de severidad de $3,84\text{-}4,07$, tras la cual se reduce

por la degradación de la arabinosa a furfural. La naturaleza lábil de este monosacárido, junto a que se presenta en las ramificaciones de la hemicelulosa y no en la cadena principal, favorece la liberación de la arabinosa (Silva-Fernandes y col., 2015).

Con respecto a la glucosa, el monómero procedente de la celulosa, se observa un incremento gradual en la fase líquida conforme aumentan las condiciones de temperatura y tiempo de operación, producida por la rotura del enlace que une a estos monómeros, el enlace glucosídico. Tal y como se comenta en el análisis de la fase sólida (epígrafe 6.1.2), la glucosa liberada procede de la celulosa más amorfa y fácilmente hidrolizable (Gütsch y col., 2012; Krogell y col., 2013; Li y col., 2014a).

El monosacárido que alcanza mayor concentración en la fase líquida es la manosa, con un 4,96 g/L en las condiciones más severas (AH-6, $S_0 = 4,67$, 198 °C y 60 min), dado que es el principal azúcar que conforma las hemicelulosas de la madera de *Pinus radiata*, concordando así con la caída que se produce en la concentración de su oligosacárido por encima de un factor de severidad de 3,84.

El otro azúcar con mayor presencia en la fase líquida es la xilosa, alcanzando una concentración de 3,51 g/L a la severidad de $S_0 = 4,13$ (AH-9, 190 °C y 30 min). De forma paralela a la otra pentosa, la arabinosa, tras su máximo de concentración, desciende por su degradación a furfural (Marzioletti y col., 2008).

A fin de estudiar las tendencias de los azúcares de forma global en la fase líquida, en la Figura 6.19 se representan los sumatorios de concentración de pentosas y hexosas frente al factor de severidad del tratamiento (S_0).

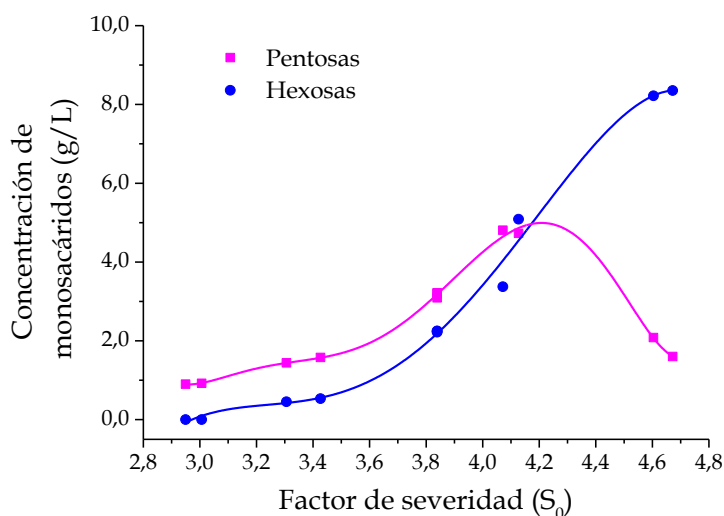


Figura 6.19. Concentración de pentosas y hexosas (g/L) frente al factor de severidad (S_0) del tratamiento de autohidrólisis.

La concentración de las pentosas (arabinosa y xilosa) es mayor que las hexosas (glucosa, manosa y galactosa) en todas las condiciones de operación en las que el factor de severidad es inferior a $S_0 = 4,07$. La mayor concentración de pentosas en las condiciones más suaves se debe a que estos azúcares se hidrolizan y se liberan a la fase líquida antes que aquellos formados por seis carbonos, dada su naturaleza lábil (Silva-Fernandes y col., 2015).

A partir de esas condiciones, su concentración disminuye desde los 4,8 g/L (3,6 g/100 g de madera), ya que se producen las reacciones de deshidratación de las pentosas para dar lugar al furfural, como se demuestra en el siguiente apartado (6.2.2). A diferencia de las pentosas, las hexosas, en todo el intervalo estudiado incrementan su concentración con la severidad del tratamiento, alcanzado una concentración de 8 g/L, es decir, 6,7 g de hexosas por cada 100 g de madera de pino, en las condiciones más severas ($S_0 = 4,67$).

Una corriente rica en azúcares monoméricos procedentes de la madera de pino, tanto en pentosas y hexosas, se obtiene cuando la severidad de tratamiento, en el intervalo estudiado, es de $S_0 = 4,13$ (AH-9, 190 °C y 30 min). En estas condiciones, se alcanza la máxima concentración de hexosas y pentosas en el medio, sin que se encuentren degradadas. Esta concentración es igual a 9,81 g/L, específicamente, 4,73 g/L de pentosas y 5,09 g/L de hexosas. Estos datos suponen una extracción de las

hemicelulosas en forma monomérica que corresponden al 45 % de las pentosas iniciales y al 7 % de las hexosas iniciales.

6.2.2.3. Productos de degradación

Los productos de degradación que se han detectados en el análisis mediante HPLC son el ácido acético (AA), el ácido fórmico (AF), el furfural (F) y el hidroximetilfurfural (HMF). Estos productos se presentan en la Tabla 6.21.

Tabla 6.21. Concentración de los productos de degradación en la fase líquida de autohidrólisis (g/L).

Experimento	AA	AF	F	HMF
AH-1	0,26	0,43	-	-
AH-2	0,63	0,61	0,19	0,10
AH-3	0,23	0,26	-	-
AH-4	0,35	0,43	-	-
AH-5	0,15	0,19	-	-
AH-6	2,66	1,33	1,74	3,57
AH-7	0,93	0,61	0,46	0,28
AH-8	2,65	1,46	1,61	2,96
AH-9	1,00	0,71	0,51	0,50
AH-10	0,63	0,66	0,18	0,11
AH-11	0,63	0,66	0,19	0,11

-: no detectado

Estos productos de degradación proceden de la descomposición de los carbohidratos durante la autohidrólisis. Estos mismos compuestos han sido cuantificados por otros autores al trabajar con otros materiales lignocelulósicos como madera de eucalipto, mezcla de maderas blandas, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar o biomasa de palma de aceite (Romaní y col., 2010; Pu y col., 2013; Ertas y col., 2014; Batalha y col., 2015; Zakaria y col., 2015).

En la Figura 6.20 se muestra el sumatorio de estos productos de degradación a fin de comprobar la tendencia que presentan frente al factor de severidad de los ensayos del diseño de autohidrólisis. Se observa que el incremento de la severidad de tratamiento supone un aumento en la concentración de los productos de degradación en el medio, los cuales proceden directamente de la hemicelulosa por la liberación de

los grupos acetilo (ácido acético) o de la degradación de los monómeros (pentosas y hexosas). Dichos azúcares monoméricos se generan en la despolimerización de los oligosacáridos solubilizados en la fase líquida. Así, la deshidratación de las pentosas genera furfural; mientras que la de las hexosas da lugar a hidroximetilfurfural (HMF). El ácido fórmico procede a su vez de la degradación de estos furanos. La mayor severidad del tratamiento favorece tanto las reacciones de despolimerización como las de degradación de los monómeros.

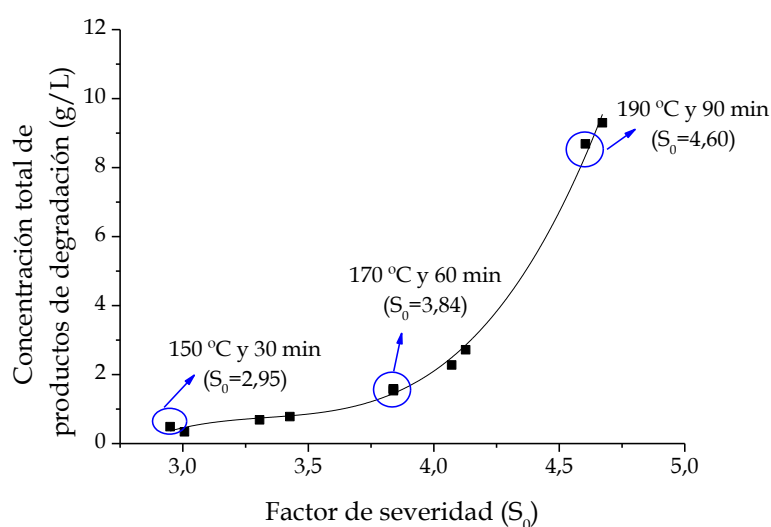


Figura 6.20. Concentración de productos de degradación (g/L) frente al factor de severidad (S_0) del tratamiento de autohidrólisis.

Dentro de las condiciones estudiadas, el sumatorio de los productos de degradación se incrementa con las condiciones de temperatura y tiempo, alcanzando los 9,5 g/L totales, lo que supone 7,4 g de estos compuestos por cada 100 g de madera de pino. En la Figura 6.21 se muestran la distribución de los productos de degradación en las condiciones de baja severidad de tratamiento ($S_0 = 2,95$), media ($S_0 = 3,84$) y alta ($S_0 = 4,60$).

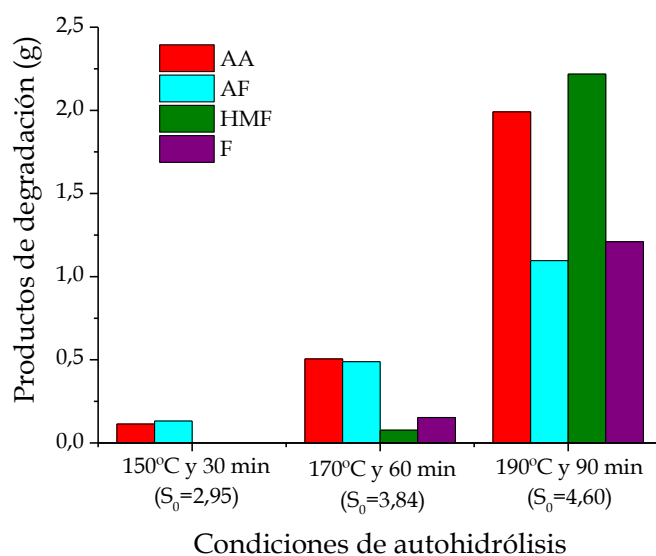


Figura 6.21. Productos de degradación en la fase líquida de autohidrólisis.

Uno de los principales productos de degradación que se forma en la fase líquida es el ácido acético. Como ya se ha comentado, este ácido se origina por la liberación de los grupos acetilo de la hemicelulosa de la madera de pino y se trata de uno de los responsables del efecto autocatalítico de este tratamiento hidrotérmico (Hou y col., 2014). Además, junto al ácido acético, se produce el ácido fórmico a partir de la degradación de las pentosas, mediante la formación intermedia del furfural (Figura 3.4). Con el incremento de la temperatura y el tiempo se favorece la concentración de dichos ácidos en el medio, siendo más acentuado en el caso del ácido acético, que alcanza los 2 g, frente al fórmico que obtiene un 1,1 g por cada 100 g de madera de pino. Este incremento de concentración de ácidos está en concordancia con la caída de pH en la fase líquida. Similares tendencias obtuvieron Ertas y col. (2014) al trabajar con paja de trigo y usar condiciones de 200 °C y 20 min ($S_0 = 4,25$) en autohidrólisis.

Junto con los ácidos acético y fórmico, aparecen otros dos productos de degradación, el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF). Bajo condiciones intermedias de tratamiento ($S_0 = 3,84$, 170 °C y 60 min), la concentración de furfural (0,19 g/L) es mayor que la de hidroximetilfurfural (0,11 g/L), dando lugar a 0,15 g y 0,08 g, respectivamente, por cada 100 g de madera de pino. Este hecho se asocia a que la hidrólisis de las pentosas es más fácil y su consecuente degradación en el medio (Gonzalez-Muñoz y col., 2012). Sin embargo, bajo condiciones severas ($T \geq 190$ °C), la concentración más alta corresponde al hidroximetilfurfural procedente de las hexosas

(HMF). En el experimento AH-8 ($S_0 = 4,60$, $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 90 min) se obtiene una concentración de este compuesto de $2,96\text{ g/L}$ frente a los $1,61\text{ g/L}$ del furfural. La mayor concentración de HMF frente a la de furfural se debe a que bajo esas condiciones de operación, las hexosas, principales monómeros que conforman la hemicelulosa del pino, se deshidratan para dar lugar a este compuesto (Marzialetti y col., 2008; Rivas y col., 2016).

En otros estudios, el principal producto de degradación en todo el intervalo estudiado corresponde al furfural. El motivo de esta diferencia es la materia prima de partida y su composición. Si las hemicelulosas se componen principalmente de xilosa, su compuesto de degradación mayoritario es el furfural. Este es el caso de materias primas como la madera de eucalipto, el bambú, la paja de trigo o la palma de aceite (Romaní y col., 2010; Gütsch y col., 2012; Ertas y col., 2014; Li y col., 2014a; Zakaria y col., 2015). Sin embargo, la materia prima utilizada en este trabajo, madera de pino, se compone por hemicelulosas cuyo azúcar principal es una hexosa, la manosa, y cuyo producto de degradación es el hidroximetilfurfural.

En la Figura 6.22 se muestran las diferentes tonalidades de la fase líquida resultante de los diferentes experimentos del diseño de autohidrólisis, ordenadas según el número asignado en el mismo.



Figura 6.22. Tonalidades obtenidas en la fase líquida del diseño de autohidrólisis.

Se observa como el color de estas fases se va oscureciendo a medida que la severidad del tratamiento se incrementa. En las condiciones más suaves, AH-3 ($150\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 30 min , $S_0 = 2,95$) y AH-5 ($142\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 60 min , $S_0 = 3,01$), se aprecia un color amarillento casi incoloro; mientras que en las condiciones más severas de tratamiento, AH-6 ($198\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 60 min , $S_0 = 4,67$) y AH-8 ($190\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 90 min , $S_0 = 4,60$), presentan una tonalidad

marrón. Estas tonalidades más oscuras se relacionan con un mayor contenido en furanos, furfural e hidroximetilfurfural, en estas fases líquidas (AH-6 y AH-8), donde alcanzan concentraciones de 5,3 g/L y 4,6 g/L, respectivamente.

Se comprueba que unas condiciones de tratamiento muy severas ($S_0 \geq 4,60$) favorecen la generación de productos de degradación a partir de las hemicelulosas liberadas a la fase líquida. Por tanto, si se pretende obtener una corriente rica en hemicelulosas pero sin degradación de las mismas, las condiciones de operación tienen que ser moderadas como se detalla a continuación.

6.3. Selección de las condiciones del tratamiento de autohidrólisis

La selección de las condiciones favorables del tratamiento de autohidrólisis se ha realizado atendiendo a una situación de compromiso entre la eliminación de la hemicelulosas de la madera de pino y la forma en la que éstas se encuentran en la fase líquida. Se ha buscado una alta extracción de hemicelulosas de la madera, pero sin que éstas se encuentren degradadas en la fase líquida, es decir, máxima cantidad de oligosacáridos y mínima cantidad de productos de degradación. Así pues, las condiciones más favorables para el tratamiento de autohidrólisis para la madera de *Pinus radiata* son las siguientes:

Condiciones favorables de autohidrólisis
Temperatura: 170 °C
Tiempo: 60 min

La combinación de esta temperatura y este tiempo, da lugar a un factor de severidad de 3,84. En estas condiciones se alcanzaba la concentración máxima de oligosacáridos de hemicelulosas en la fase líquida (12,7 g/L; 11 g), junto con la menor proporción de productos de degradación (1,6 g/L; 1,2 g). Esta selección de condiciones está próxima a las elegidas por otros autores para otros materiales lignocelulósicos. Moniz y col. (2013) eligieron para paja de maíz una severidad de $S_0=3,75$, correspondiendo a 215 °C en condiciones no isotermas; Buruiana y col. (2014) plantearon un intervalo de severidad entre 3,80-4,21 para los rastrojos de maíz,

seleccionándolos dentro del marco de la biorrefinería; Moniz y col. (2015) optaron por una severidad de 3,75 para los residuos de coco y así obtener una buena extracción de oligosacáridos con baja concentración de productos de degradación.

Con las condiciones seleccionadas se solubiliza un 22 % de la madera original, quedando un sólido con una composición de 52 % en celulosa, 2,9 % en xilano, 2 % en galactano, 5,4 % en manano y 37,5 % en lignina total. Estos resultados suponen que la extracción de las hemicelulosas iniciales de la madera de pino alcanza un 62 %. Además, respecto a los polímeros que permanecen en la fase sólida tras el tratamiento, la celulosa y la lignina, éstos presentan un porcentaje muy alto en relación a su contenido inicial, superior al 90 %.

Tras la extracción de hemicelulosas, este sólido se somete a un proceso de deslignificación organosolv para recuperar la lignina remanente en él y convertir su fracción celulósica a glucosa mediante una etapa final de hidrólisis enzimática (Capítulo 8).

7. PROCESO ORGANOSOLV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. PROCESO ORGANOSOLV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se exponen los resultados y discusión del segundo bloque experimental de este trabajo, el estudio del tratamiento organosolv de la madera de pino, en el cual se emplea la metodología de diseño de experimentos. Las variables independientes que se estudian son la concentración de etanol, la temperatura y el tiempo. Las variables dependientes estudiadas están relacionadas con las tres fracciones obtenidas en el tratamiento: la fase sólida (sólido deslignificado), la lejía negra y la lignina precipitada organosolv.

En primer lugar se exponen y discuten los resultados de la caracterización de la fase sólida. Además de conocer el porcentaje de sólido tratado y su composición, se analiza su estabilidad térmica y los cambios que se producen en sus grupos funcionales. En el apartado 7.2 se recogen los análisis de la lejía negra, la medida del pH y la cuantificación de los compuestos presentes en ella. Finalmente, en el apartado

7.3 de este capítulo se caracteriza la lignina organosolv precipitada a partir de la lejía negra, analizando la distribución de pesos moleculares y la estabilidad térmica. Se pretende encontrar las condiciones de concentración de etanol, temperatura y tiempo de tratamiento que den lugar a un sólido deslignificado rico en celulosa, y además, un alto rendimiento en la recuperación de la lignina extraída.

7.1. Caracterización del sólido deslignificado

En este epígrafe se exponen los resultados de las variables dependientes obtenidas para los 17 experimentos del diseño del tratamiento organosolv para el sólido deslignificado. Se cuantifica el sólido que queda tras el tratamiento y se determina su contenido en carbohidratos, celulosa y hemicelulosa, y lignina. Finalmente, el estudio se completa con el análisis del sólido deslignificado mediante termogravimetría y espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier.

7.1.1. Porcentaje de sólido tratado

El porcentaje de sólidos tratados obtenido en cada ensayo del diseño organosolv ST_{ORG} (%), se calcula empleado la ecuación [5.10]. Los resultados para este tratamiento se muestran en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Sólidos tratados obtenidos en el organosolv.

Experimento	ST _{ORG} (%)
ORG-1	59,0
ORG-2	66,0
ORG-3	43,5
ORG-4	79,6
ORG-5	77,4
ORG-6	63,7
ORG-7	65,9
ORG-8	71,5
ORG-9	65,7
ORG-10	52,5
ORG-11	74,9
ORG-12	81,3
ORG-13	44,6
ORG-14	59,9
ORG-15	75,8
ORG-16	60,9
ORG-17	69,5

Los efectos de las variables estudiadas, porcentaje de etanol (C), temperatura (T) y tiempo (t), junto con los efectos de sus interacciones se recogen en Tabla 7.2. A su vez, se indican los errores de los efectos basados en el error puro con 2 grados de libertad.

Tabla 7.2. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre ST_{ORG}.

Efecto	Valor \pm Error
C	9,847 \pm 0,658
T	-20,923 \pm 0,658
t	-5,906 \pm 0,658
C ²	1,519 \pm 0,725
CT	4,275 \pm 0,860
Ct	1,475 \pm 0,860
T ²	-1,699 \pm 0,725
Tt	-1,375 \pm 0,860
t ²	0,988 \pm 0,725
Media	65,069 \pm 0,701

El análisis de varianza de estos efectos se muestra en Tabla 7.3. Al igual que en el estudio de la madera autohidrolizada, los criterios seguidos para la exclusión de los efectos es que presente una distribución de Fisher (F) mayor 18,51 y que el valor de la probabilidad P sea menor a 0,05. El valor F corresponde a un valor tabulado al considerar un nivel de significancia del 95 %, con grados de libertad del efecto y del error puro igual a 1 y 2, respectivamente. De nuevo, se muestran en rojo aquellos efectos que se consideran no significativos y se indica la falta de ajuste antes y después de eliminar estos efectos.

Tabla 7.3. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre ST_{ORG} .

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
C	331,063	1	331,063	223,69	0,0044
T	1494,660	1	1494,660	1009,91	0,0010
t	119,081	1	119,081	80,46	0,0122
C ²	6,500	1	6,500	4,39	0,1711
CT	36,551	1	36,551	24,70	0,0382
Ct	4,351	1	4,351	2,94	0,2285
T ²	8,132	1	8,132	5,49	0,1438
Tt	3,781	1	3,781	2,55	0,2511
t ²	2,753	1	2,753	1,86	0,3058
Falta de ajuste	(7,953)	(5)	(1,591)	(1,07)	(0,5466)
	40,274	10	4,027	2,72	0,2985
Error puro	2,960	2	1,480		
Total	2024,590	16			

(): Valores para la falta de ajuste del análisis de varianza inicial

Los efectos que resultan significativos sobre esta respuesta son las tres variables independientes (C, T y t) y la interacción CT. El modelo obtenido empleando estas variables como términos se muestra en la ecuación [7.1], junto con el coeficiente de correlación, el error estándar de la estimación y el medio absoluto.

ST_{ORG} (%)

$$ST_{ORG} (\%) = 310,473 - 2,14389C - 1,40994T - 0,118115t + 0,01425CT \quad [7.1]$$

$$R^2 = 97,86 \%$$

Error estándar de la estimación = 1,216

Error medio absoluto = 1,245

La representación de los porcentajes de sólidos tratados predichos por el modelo frente a los valores experimentales se muestra en la Figura 7.1, donde se puede comprobar la buena concordancia que existe entre los pares de valores y, por tanto, la bondad del ajuste.

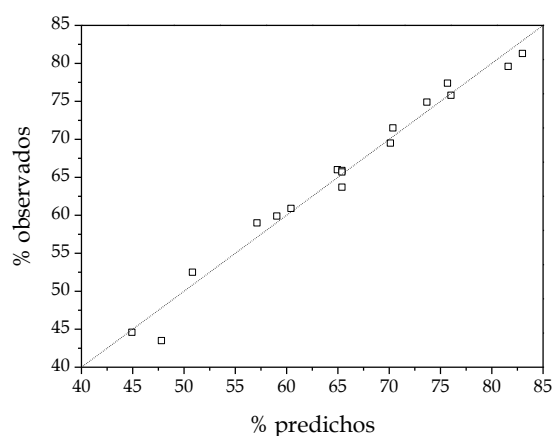


Figura 7.1. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para ST_{ORG} (%).

En la Figura 7.2 se muestra el mapa de contorno para el porcentaje de sólidos tratados obtenidos en la deslignificación organosolv (ST_{ORG}) manteniendo fija una de las variables en su valor medio (la concentración de etanol al 50 %, 75 min de reacción y 185 °C de temperatura).

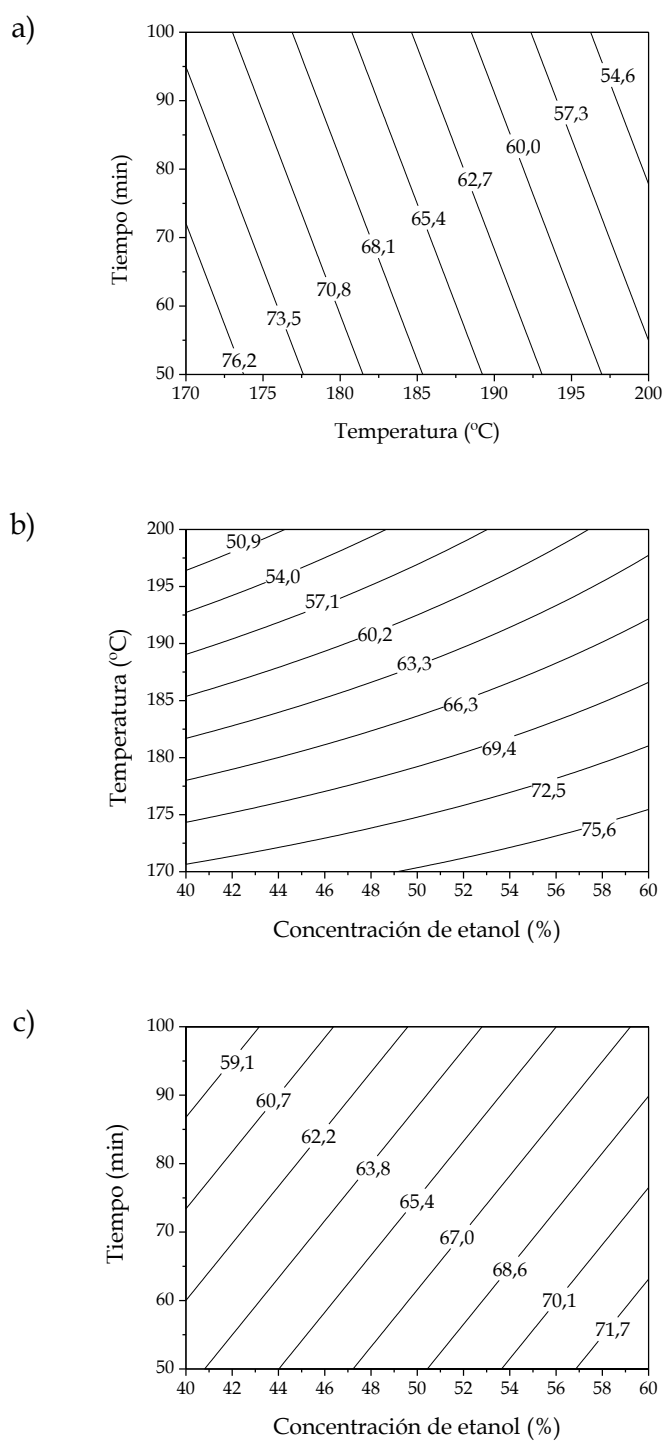


Figura 7.2. Mapa de contorno de ST_{ORG} (%): a) $C_{EtOH} = 50$ %, b) $t = 75$ min y c) $T = 185$ °C.

Los porcentajes de sólido deslignificado tras el proceso organosolv en el intervalo estudiado varían entre 44,6 y 79,6 %. Estos valores son similares a los obtenidos por otros autores para materiales lignocelulósicos, con un intervalo de 43,1-82,8 % para la paja de trigo, aplicando temperaturas de 160 y 220 °C, usando un 50 % de etanol y 60 min (Huijgen y col., 2010) o el de 51-81 % en el proceso organosolv empleando glicerol como disolvente a temperaturas de 180-200 °C y tiempos de 40-90 min (Romaní y col., 2013).

La variación de estos porcentajes se debe a la diferente solubilización de sus fracciones, especialmente la hemicelulosa y la lignina hacia la fase líquida (lejía negra), en función de las condiciones de tratamiento. La variable que más influencia tiene sobre los sólidos tratados es la temperatura, a diferencia del tiempo y la concentración de etanol, cuyos efectos son menores como se recoge en la Tabla 7.2. El incremento de la intensidad de tratamiento (temperatura y tiempo) implica una menor cantidad de sólidos tratados, mientras que el incremento de la concentración de etanol supone un aumento en esta respuesta. A similares conclusiones sobre la influencia de estas variables llegaron Jang y col. (2016) al trabajar con la madera *Liriodendron tulipifera* en proceso organosolv con etanol/agua como disolvente.

La solubilización de las fracciones de lignina y hemicelulosas que dan lugar a la mayor o menor cantidad de sólidos tratados depende de su hidrólisis previa. La rotura de los enlaces de estos polímeros implica la generación de pequeños fragmentos que permiten su solubilización en la lejía negra. En el proceso organosolv estudiado, al tratarse de un proceso no catalizado, la reacción de deslignificación e hidrólisis de hemicelulosas comienza con la reacción de autoionización del agua que genera iones hidronio en el medio. Estos iones generan la rotura de los enlaces de la hemicelulosas dando lugar a la liberación de sus grupos acetilo y la formación de ácido acético en la lejía. Tanto los iones procedentes de la reacción de autoionización del agua como los del ácido acético catalizan la rotura hidrolítica de los enlaces de lignina y hemicelulosas (Wildschut y col., 2013), y por ende, la eliminación de los mismos del sólido y su solubilización. Por ello, una mayor concentración de etanol de partida y una menor concentración de agua reducen tanto la hidrólisis de hemicelulosas como la deslignificación, dando lugar a una mayor cantidad de sólidos finales. Esta tendencia

obtenida con respecto a la concentración del disolvente es similar a la observada por algunos autores, trabajando con diferentes mezclas de disolventes orgánicos como acetona/agua o etanol/agua (Huijgen y col., 2010; Wildschut y col., 2013).

La cantidad de sólidos deslignificados tras el proceso organosolv depende de la eliminación de los componentes de la madera, principalmente, la lignina y las hemicelulosas de la madera inicial de pino. La extracción de estas fracciones se cuantifica mediante la composición del sólido tratado en celulosa, hemicelulosa y lignina que se detalla en el epígrafe 7.1.2.

7.1.2. Contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina

En primer lugar se determina la composición del sólido deslignificado obtenido en cada uno de los 17 experimentos procedentes del diseño de experimentos, analizando su contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina. En la Tabla 7.4 se muestra la composición de dichos sólidos. Los ajustes a los modelos matemáticos se realizan para la celulosa (C_{ORG}) y para la hemicelulosa de forma global, es decir, el sumatorio de los tres polímeros cuantificados en los sólidos deslignificados, el xilano, el galactano y el manano, expresado como hemicelulosas totales (HMC_{ORG}). Además, a partir de la lignina insoluble, se ajusta la respuesta del grado de deslignificación (GD), calculada a partir de la ecuación [5.11]. Se exponen las composiciones tanto en porcentaje sobre el sólido tratado obtenido en el proceso organosolv (g/100 g de sólido deslignificado), como en porcentaje en masa con respecto al material de partida (g/100 g de madera de pino).

Tabla 7.4. Contenido en carbohidratos y lignina del sólido deslignificado expresado en g/100 g de sólido deslignificado.

Expt.	C _{ORG}	X _{ORG}	G _{ORG}	M _{ORG}	HMC _{ORG}	LS _{ORG}	LI _{ORG}
ORG-1	58,6 (34,5)	3,9 (2,3)	0,4 (0,2)	6,1 (3,6)	10,4 (6,1)	3,9 (2,3)	24,4 (14,4)
ORG-2	56,6 (37,3)	4,5 (3,0)	0,7 (0,4)	12,4 (8,2)	17,6 (11,6)	3,2 (2,1)	19,0 (12,5)
ORG-3	71,0 (30,9)	4,1 (1,8)	0,4 (0,2)	7,2 (3,1)	11,7 (5,1)	4,3 (1,9)	11,1 (4,8)
ORG-4	48,9 (38,9)	4,7 (3,8)	2,2 (1,7)	13,3 (10,6)	20,2 (16,1)	3,6 (2,9)	22,5 (17,9)
ORG-5	47,7 (36,9)	4,5 (3,5)	2,0 (1,5)	13,5 (10,5)	20 (15,5)	4,9 (3,8)	21,2 (16,4)
ORG-6	55,2 (35,2)	4,2 (2,7)	0,9 (0,6)	12,5 (8,0)	17,6 (11,2)	4,4 (2,8)	20,1 (12,8)
ORG-7	56,2 (37,0)	4,1 (2,7)	0,7 (0,4)	11,7 (7,7)	16,5 (10,9)	4,6 (3,0)	17,7 (11,7)
ORG-8	50,2 (35,9)	4,4 (3,2)	1,4 (1,0)	12,4 (8,9)	18,2 (13,0)	4,6 (3,3)	20,3 (14,5)
ORG-9	54,3 (35,7)	4,2 (2,8)	0,9 (0,6)	12,0 (7,9)	17,1 (11,2)	4,3 (2,9)	18,9 (12,4)
ORG-10	72,0 (37,8)	4,1 (2,1)	0,5 (0,3)	5,1 (2,7)	9,7 (5,1)	3,6 (1,9)	17,9 (9,4)
ORG-11	52,1 (39,0)	4,8 (3,6)	1,9 (1,4)	12,5 (9,4)	19,2 (14,4)	5,3 (4,0)	19,7 (14,7)
ORG-12	47,8 (38,9)	4,7 (3,9)	2,2 (1,8)	11,1 (9,1)	18 (14,6)	4,6 (3,7)	23,8 (19,4)
ORG-13	72,4 (32,3)	3,7 (1,7)	0,4 (0,2)	4,7 (2,1)	8,8 (3,9)	4,8 (2,1)	14,9 (6,6)
ORG-14	60,5 (36,2)	4,6 (2,7)	0,3 (0,2)	11,3 (6,8)	16,2 (9,7)	5,6 (3,4)	17,1 (10,2)
ORG-15	51,8 (39,3)	4,8 (3,7)	2,0 (1,5)	11,9 (9,0)	18,7 (14,2)	4,1 (3,1)	22,3 (16,9)
ORG-16	59,0 (35,9)	4,1 (2,5)	0,6 (0,4)	11,5 (7,0)	16,2 (9,9)	4,5 (2,7)	14,4 (8,8)
ORG-17	53,0 (36,8)	4,5 (3,1)	1,0 (0,7)	10,1 (7,0)	15,6 (10,8)	4,7 (3,2)	18,7 (13,0)

(): g/100 g de madera de pino

A continuación se detallan los análisis de cada una de las respuestas consideradas en este estudio.

7.1.2.1. Celulosa

La celulosa representa el componente principal del sólido deslignificado obtenido en los diferentes ensayos que componen el diseño de experimentos organosolv, alcanzando valores comprendidos entre un 49 y un 72 % del total de dicho sólido. En la Tabla 7.5 se muestran los efectos de los factores principales y sus interacciones sobre el porcentaje de celulosa presente en el sólido deslignificado tras el tratamiento organosolv (C_{ORG} (%)). Asimismo, se indican los errores de dichos valores basados en el error puro con 2 grados de libertad.

Tabla 7.5. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre C_{ORG}.

Efecto	Valor ± Error
C	-6,813 ±0,509
T	14,533 ±0,509
t	2,799 ±0,509
C ²	0,644 ±0,560
CT	-4,770 ±0,665
Ct	0,260 ±0,665
T ²	3,543 ±0,560
Tt	1,080 ±0,665
t ²	0,135 ±0,560
Media	55,167 ±0,542

El análisis de varianza de esta respuesta se recoge en la Tabla 7.6, donde se muestran en rojo los efectos no significativos y que, por tanto, no formarán parte del modelo.

Tabla 7.6. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre C_{ORG}.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
C	158,472	1	158,472	179,18	0,0055
T	721,064	1	721,064	815,28	0,0012
t	26,757	1	26,757	30,25	0,0315
C ²	1,168	1	1,168	1,32	0,3694
CT	45,506	1	45,506	51,45	0,0189
Ct	0,135	1	0,135	0,15	0,7335
T ²	35,375	1	35,375	40,00	0,0241
Tt	2,333	1	2,333	2,64	0,2458
t ²	0,051	1	0,051	0,06	0,8325
Falta de ajuste	46,719	5	9,344	10,56	0,0887
Error puro	1,769	2	0,884		
Total	1040,820	16			

El nuevo análisis de varianza que se obtiene al eliminar los efectos no significativos se muestra en la Tabla 7.7. En este caso, los efectos que se han excluido son las interacciones Ct y Tt y los efectos cuadráticos de la concentración de etanol (C²) y tiempo (t²).

Tabla 7.7. Valor y análisis de varianza de los efectos significativos sobre C_{ORG}.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
C	158,472	1	158,472	179,18	0,0055
T	721,064	1	721,064	815,28	0,0012
t	26,757	1	26,757	30,25	0,0315
CT	45,506	1	45,506	51,45	0,0189
T ²	36,890	1	36,890	41,71	0,0231
Falta de ajuste	50,365	9	5,596	6,33	0,1439
Error puro	1,769	2	0,884		
Total	1040,820	16			

El ajuste de los resultados da lugar al modelo que se presenta en la ecuación [7.2], junto con el coeficiente de correlación R², el error estándar de la estimación y el error medio absoluto.

Celulosa _{ORG} (%)
$C_{ORG} (\%) = 87,6443 + 2,60086C - 1,48763T + 0,0559885t - 0,0159CT + 0,00747852T^2$
R ² = 94,99 %
Error estándar de la estimación = 0,940
Error medio absoluto = 1,464

Para comprobar la bondad del ajuste, se presentan los valores de la celulosa en el sólido deslignificado observada experimentalmente frente a la predicha por dicho modelo. En la Figura 7.3 se observa que los puntos se distribuyen alrededor de la diagonal, que representa el error cero y, por tanto, la bondad del ajuste se considera aceptable.

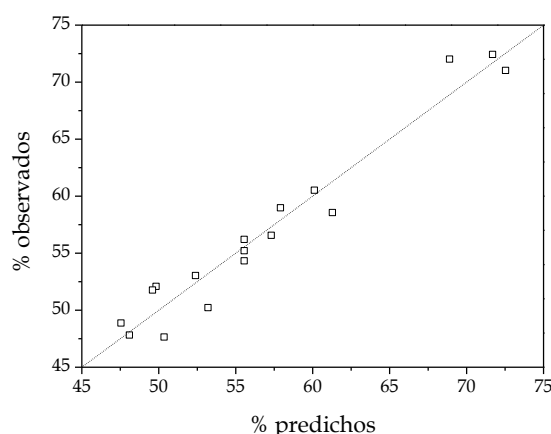


Figura 7.3. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para C_{ORG} (%).

En la Figura 7.4 se presentan los mapas de contorno del porcentaje de celulosa en el sólido deslignificado para las variables del diseño, dejando fija la tercera en su valor del punto central: 50 % de concentración de etanol, 75 min y 185 °C.

Como se observa en la Figura 7.4b, a bajas concentraciones de etanol (40 %), el incremento de temperatura produce un aumento del porcentaje de celulosa en el sólido deslignificado más acusado que el que se produce a concentraciones de etanol altas (60 %). Al aumentar de 170 °C a 200 °C, el porcentaje de celulosa se incrementa un 18 % al 40 % de etanol frente al aumento del 10 % que se produce al 60 % de etanol. A altas temperaturas (200 °C), el efecto de la concentración de etanol en el disolvente de partida es más destacado, ya que el porcentaje de celulosa obtenido al 40 % de etanol es del 69 % frente al 57 % obtenido al partir de un 60 % de concentración de etanol.

Esta variación del porcentaje de celulosa en el sólido deslignificado está relacionada con la eliminación de las otras fracciones que componen la madera, las hemicelulosas y la lignina. La concentración baja de etanol y, por tanto, la mayor acidez del medio de reacción, presenta una mayor concentración de los iones hidronio que dan lugar a la rotura hidrolítica de los enlaces de estas fracciones; permitiendo así su extracción del sólido y la solubilización en la lejía negra de los fragmentos generados. Este efecto de la concentración de etanol sobre el contenido en celulosa del material tratado también fue confirmado por Wildschut y col. (2013) al trabajar con paja de trigo y este mismo disolvente.

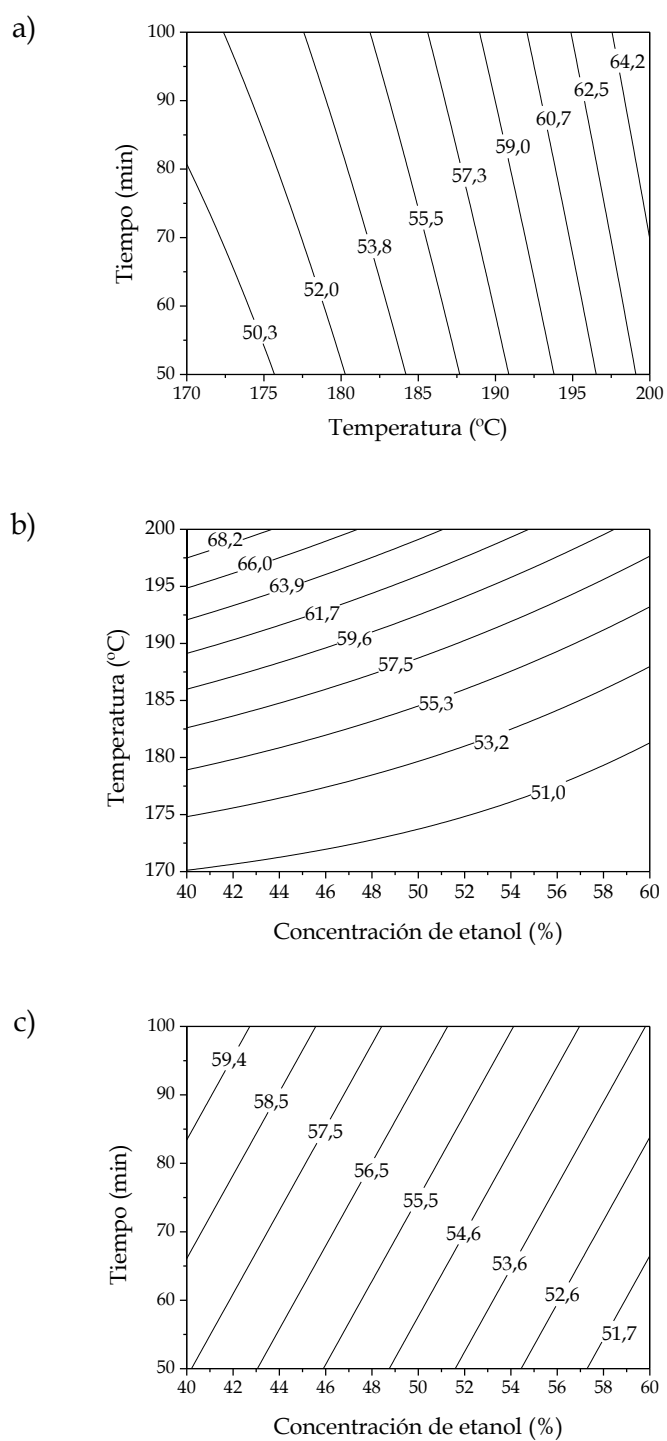


Figura 7.4. Mapa de contorno de C_{ORG} (%): a) $C_{EtOH} = 50\%$, b) $t = 75$ min y c) $T = 185^{\circ}C$.

En cuanto a la influencia del tiempo de tratamiento sobre el porcentaje en celulosa en el sólido deslignificado, se observa tanto en la Figura 7.4a como en la Figura 7.4c que su influencia es suave, apenas se incrementa un 2-3 %, al pasar del nivel más bajo (50 min) al más alto (100 min).

Los porcentajes de celulosa en el sólido deslignificado oscilan entre un 49 y un 72 %. Estos valores se encuentran en concordancia con otras biomásas como los obtenidos por Huijgen y col. (2010), cuyos porcentajes de celulosa en la paja de trigo tras un proceso organosolv empleando una mezcla de etanol/agua al 50 %, 60 min y temperaturas entre los 160 y 220 °C variaban en el intervalo de 40,3 y 73,4 % o por Romaní y col. (2013), que alcanzaron valores entre 54 y 83 % de celulosa en la madera de eucalipto deslignificada mediante un tratamiento con glicerol empleando temperaturas entre 180 y 200 °C, tiempos de 40-90 min y 40-80 % de concentración de disolvente.

La hidrólisis de la celulosa durante el tratamiento organosolv es limitada por lo que gran parte de la celulosa inicial de la madera se conserva. Ello explica que el valor medio de la pérdida de la celulosa sea menor al 18 %. Esta celulosa eliminada se asocia a las regiones más amorfas del polímero que son más fácilmente hidrolizables (Krogell y col., 2013). La celulosa inicial de la madera de *Pinus radiata* que se mantiene en los sólidos deslignificados se encuentra entre el 70 y 90 %. Estos valores se encuentran en línea con los obtenidos en otros tipos de madera en tratamientos organosolv, como el 75 % para *Pinus contorta*, 85 % para *Buddleja davidii*, 88 % para *Populus nigra* x *P. maximowiczii*, 94 % para *Eucalyptus globulus*, o el 85 % obtenido en residuos agrícolas (*Phoenix dactylifera* L.) (Pan y col., 2006a; Pan y col., 2007; Hallac y col., 2010a; Romaní y col., 2013; Cybulska y col., 2017).

El proceso organosolv da lugar a la obtención de un sólido que presenta altos porcentajes de la celulosa inicial de la madera, tras la extracción de las fracciones de hemicelulosas y lignina, permitiendo que pueda ser empleado en etapas posteriores como la hidrólisis enzimática o la sacarificación y fermentación simultánea para aprovechar la celulosa.

7.1.2.2. Hemicelulosas

La eliminación de hemicelulosas durante el tratamiento organosolv se puede conocer con su contenido en el sólido deslignificado obtenido. La respuesta modelizada en este apartado es la hemicelulosa del sólido deslignificado (HMC_{ORG}), que corresponde al sumatorio de los tres polímeros que la componen (xilano, galactano y manano). En la caracterización de la composición de estos sólidos, la arabinosa no ha sido detectada, lo que indica que esta pentosa se hidroliza y solubiliza en la fase líquida (lejía negra) incluso a las condiciones más suaves de tratamiento.

En la Tabla 7.8 se recogen los efectos de los factores principales, la concentración de etanol (C), la temperatura (T) y el tiempo (t), sus interacciones (CT, Ct y Tt) y los efectos cuadráticos (C^2 , T^2 y t^2) sobre la hemicelulosa en el sólido deslignificado. Además, se incluyen los errores de dichos efectos.

Tabla 7.8. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre HMC_{ORG} .

Efecto	Valor \pm Error
C	5,272 0,298
T	-4,803 0,298
t	-1,313 0,298
C^2	-1,460 0,328
CT	2,350 0,389
Ct	0,600 0,389
T^2	-1,425 0,328
Tt	0,250 0,389
t^2	0,237 0,328
Media	17,046 0,317

El análisis de varianza de estas respuestas, bajo un nivel de confianza del 95 %, se realiza para determinar qué efectos son los significativos. En la Tabla 7.9 se muestra el análisis ANOVA de la hemicelulosa del sólido deslignificado.

Tabla 7.9. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre HMC_{ORG}.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
C	94,896	1	94,896	312,84	0,0032
T	78,754	1	78,754	259,63	0,0038
t	5,883	1	5,883	19,40	0,0479
C ²	6,009	1	6,009	19,81	0,0470
CT	11,045	1	11,045	36,41	0,0264
Ct	0,720	1	0,720	2,37	0,2633
T ²	5,721	1	5,721	18,86	0,0491
Tt	0,125	1	0,125	0,41	0,5867
t ²	0,158	1	0,158	0,52	0,5452
Falta de ajuste	4,511	5	0,902	2,97	0,2706
Error puro	0,607	2	0,303		
Total	208,205	16			

En la Tabla 7.10 se recoge el análisis de varianza obtenido al eliminar los efectos no significativos, al no cumplir con los criterios fijados ($P < 0,05$ y $F > 18,51$). Los efectos eliminados son los correspondientes a las interacciones de la temperatura, CT y Tt, y el cuadrático del tiempo t².

Tabla 7.10. Valor y análisis de varianza de los efectos significativos sobre HMC_{ORG}.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
C	94,896	1	94,896	312,84	0,0032
T	78,754	1	78,754	259,63	0,0038
t	5,883	1	5,883	19,40	0,0479
C ²	7,229	1	7,229	23,83	0,0395
CT	11,045	1	11,045	36,41	0,0264
T ²	6,899	1	6,899	22,74	0,0413
Falta de ajuste	5,514	8	0,689	2,27	0,3413
Error puro	0,607	2	0,303		
Total	208,205	16			

El valor P de la falta de ajuste para este modelo es de 0,3413, es decir, mayor a 0,05, lo que indica que dicho modelo ajustado mediante regresión múltiple representan adecuadamente los resultados. En la ecuación [7.3] se muestra dicho modelo, junto con el coeficiente de correlación y sus errores.

Hemicelulosas _{ORG} (%)
$\text{HMC}_{\text{ORG}} (\%) = -24,7489 - 0,420504C + 0,677257T - 0,026253t - 0,0076506C^2 + 0,00783333CT - 0,00332166T^2$
[7.3]
$R^2 = 97,06 \%$
Error estándar de la estimación = 0,551
Error medio absoluto = 0,434

A la vista de los resultados, se comprueba que el buen ajuste que presenta el modelo, ya que explica el 97,06 % de la variación de la hemicelulosa del sólido deslignificado. En la representación de los valores predichos por el modelo frente a experimentales (Figura 7.5), se observa que los puntos se encuentran próximos a la diagonal (error cero).

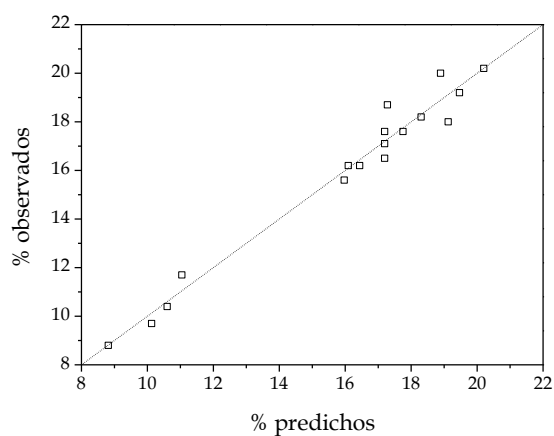


Figura 7.5. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para HMC_{ORG} (%).

A continuación se representan los mapas de contorno de esta respuesta al mantener fija la tercera variable en su punto central, es decir, 50 % de concentración de etanol, 75 min y 185 °C (Figura 7.6).

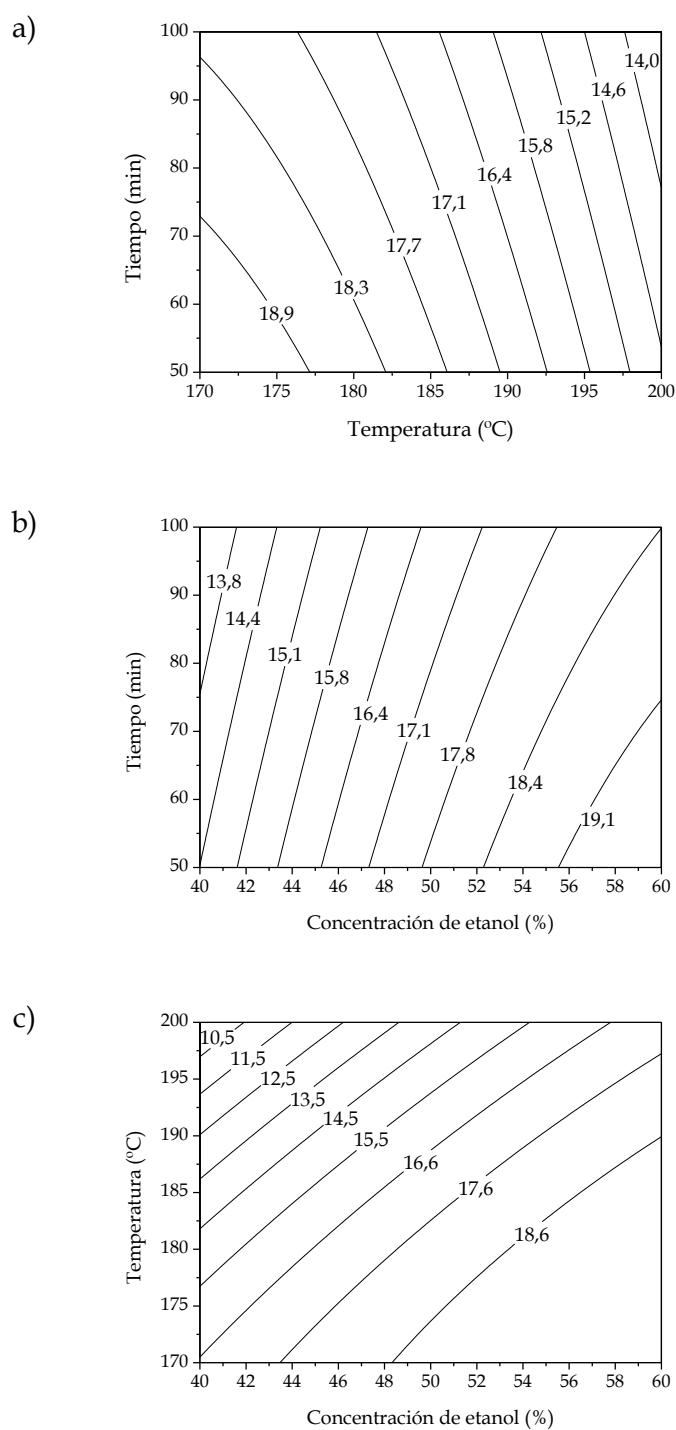


Figura 7.6. Mapa de contorno de HMC_{ORG} (%): a) C_{EtOH} = 50 %, b) t = 75 min y c) T = 185 °C.

El incremento de severidad del tratamiento organosolv, tanto en tiempo como en temperatura, supone una reducción en el contenido de hemicelulosas del sólido (Figura 7.6a). Siendo más acusada a temperaturas más elevadas, como muestra la proximidad de las isolíneas a partir de los 190 °C. Se obtiene un contenido en

hemicelulosas en el sólido deslignificado de 19,5 % en las condiciones más suaves (170 °C y 50 min) que se reduce hasta 13,4 % en las condiciones más severas (200 °C y 100 min). El incremento de la temperatura y el tiempo de operación implica una reducción del porcentaje de hemicelulosas por su despolimerización y solubilización en la lejía negra.

Con respecto a la influencia de la concentración de etanol en esta variable dependiente, se observa que el incremento del alcohol en el disolvente desde un 40 hasta un 60 % implica un aumento de la hemicelulosa en el sólido deslignificado. Por ejemplo, a condiciones fijas de temperatura y tiempo (185 °C y 100 min), este incremento de etanol da lugar a un sólido con mayor contenido en hemicelulosa, aumentando desde 14,4 hasta 18,4 % (Figura 7.6b). Del mismo modo, al emplear la temperatura en el nivel superior (200 °C), donde es más acusada la pérdida de hemicelulosa, y manteniendo el la tercera variable fija en su nivel central (75 min), el contenido de hemicelulosas se incrementa desde 9,4 hasta 16,6 % al pasar del nivel inferior al superior de etanol (Figura 7.6c). Este comportamiento se debe a que la concentración de los iones hidronio presentes en el disolvente de partida es menor cuanto más alta es la concentración de alcohol en el medio de reacción. Estos iones hidronio son los responsables de la hidrólisis de las hemicelulosas de la madera que generan los oligosacáridos y monósacaridos que se solubilizan en la lejía negra.

La eliminación de hemicelulosas iniciales de la madera de pino producida durante el proceso organosolv varía entre 24 y 81 %, correspondiendo dichos valores a los resultados de los experimentos ORG-4 y ORG-13. El primero de ellos se realiza a las condiciones más suaves de temperatura y tiempo (170 °C y 50 min) y un 60 % de etanol; mientras que el segundo se lleva a cabo bajo las condiciones más severas (200 °C y 100 min), junto con el porcentaje de etanol inferior (40 %).

En comparación con la pérdida de la celulosa que tiene lugar durante el tratamiento, con un valor medio menor al 18 %, la mayor extracción de las hemicelulosas de la madera se justifica por la naturaleza más amorfa y fácilmente hidrolizable, que favorece su despolimerización y consecuente solubilización en el medio de reacción (Ruiz y col., 2012; Li y col., 2014a).

La hidrólisis de la fracción hemicelulósica de materiales lignocelulósicos y su solubilización en procesos organosolv llevados a cabo en ausencia de catalizador también ha sido observada por diferentes autores (Huijgen y col., 2010; Wildschut y col., 2013). En el tratamiento organosolv con paja de trigo, empleando como disolvente una mezcla etanol/agua, el incremento de la temperatura desde 160 a 210 °C da lugar a un incremento de la eliminación del xilano, principal componente de la hemicelulosa de esta materia prima, de 5 a 59 %. Sin embargo, con el incremento del porcentaje de etanol desde 50 a 80 %, el xilano eliminado se reduce desde un 36 % a 7 % (Wildschut y col., 2013). Estos valores de extracción de hemicelulosas del sólido pueden ser alcanzados en procesos catalizados requiriendo menores temperaturas de operación. Koo y col. (2012) trabajando con madera de *Liriodendron tulipifera* con temperaturas comprendidas entre 120-140 °C, un 50 % de etanol y ácido sulfúrico como catalizador, conseguían eliminar entre un 37,5 y 66,5 % del xilano inicial.

En este trabajo, los porcentajes medios de los diferentes monómeros que conforman la hemicelulosa inicial de la madera de *Pinus radiata* que se mantienen en el sólido deslignificado tras el proceso organosolv se encuentran en 68,7 % para la manosa, 53,5 % para la xilosa y 24,6 % para la galactosa. Estos resultados están en concordancia con los valores de estos monómeros solubilizados en la fase líquida que fueron cuantificados por Pan y col. (2007), quienes recuperaban un 41 % de la manosa, un 45 % de la xilosa y un 78 % de la galactosa inicial de la madera de *Pinus contorta* en dicha fase líquida.

El proceso organosolv conlleva la extracción de parte de las hemicelulosas de la madera de pino, hasta alcanzar un porcentaje próximo al 80 % de las iniciales, bajo las condiciones más severas de tratamiento. La solubilización de esta fracción hemicelulósica supone el incremento del porcentaje de celulosa en el sólido deslignificado y también la pérdida de masa de los sólidos deslignificados tras el tratamiento.

7.1.2.3. Lignina

El tratamiento organosolv tiene como principal objetivo la eliminación de la lignina presente en la madera. Esta eliminación se evalúa mediante el grado de deslignificación que se determina empleando la ecuación [5.11]. Por ello, el análisis de esta respuesta (GD (%)) resulta clave en el estudio de este tratamiento. Los resultados del grado de deslignificación obtenido en cada uno de los 17 experimentos del diseño organosolv se muestran en la Tabla 7.11.

Tabla 7.11. Grado de deslignificación de los sólidos tratados del diseño organosolv.

Experimento	GD (%)
ORG-1	45,9
ORG-2	52,8
ORG-3	81,8
ORG-4	32,6
ORG-5	38,2
ORG-6	51,8
ORG-7	56,1
ORG-8	45,4
ORG-9	53,3
ORG-10	64,6
ORG-11	44,5
ORG-12	27,2
ORG-13	75,0
ORG-14	61,5
ORG-15	36,4
ORG-16	67,0
ORG-17	51,1

Los valores de los efectos principales y sus errores, así como sus interacciones, sobre el grado de deslignificación obtenido en este estudio del tratamiento organosolv se recogen en la Tabla 7.12.

Tabla 7.12. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre GD.

Efecto	Valor \pm Error
C	-6,484 \pm 1,198
T	27,450 \pm 1,198
t	11,088 \pm 1,198
C ²	-6,179 \pm 1,318
CT	-2,158 \pm 1,565
Ct	-2,708 \pm 1,565
T ²	0,394 \pm 1,318
Tt	-0,328 \pm 1,565
t ²	1,603 \pm 1,318
Media	53,761 \pm 1,275

A la vista de los resultados de la Tabla 7.12, se comprueba que la variable con mayor influencia sobre esta respuesta es la temperatura, cuyo efecto tiene un valor de 27,4 seguido del tiempo, que presenta un valor de 11. El análisis de varianza de los efectos sobre esta respuesta se recoge en la Tabla 7.13. Se observa que los efectos no significativos, mostrados en rojo y que no cumplen con los criterios de $F > 18,51$ y $P < 0,05$, son aquellos correspondientes a las interacciones CT, Ct, Tt y a los términos cuadráticos T² y t².

Tabla 7.13. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre GD.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
C	143,532	1	143,532	29,31	0,0325
T	2572,700	1	2572,700	525,44	0,0019
t	419,791	1	419,791	85,74	0,0115
C ²	107,592	1	107,592	21,97	0,0426
CT	9,310	1	9,310	1,90	0,3019
Ct	14,661	1	14,661	2,99	0,2257
T ²	0,437	1	0,437	0,09	0,7932
Tt	0,215	1	0,215	0,04	0,8536
t ²	7,243	1	7,243	1,48	0,3480
Falta de ajuste	153,479	5	30,696	6,27	0,1433
Error puro	9,793	2	4,896		
Total	3474,090	16			

Una vez eliminados los efectos no significativos, el nuevo análisis de varianza que se obtiene se muestra en la Tabla 7.14.

Tabla 7.14. Valor y análisis de varianza de los efectos significativos sobre GD.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
C	143,532	1	143,532	29,31	0,0325
T	2572,700	1	2572,700	525,44	0,0019
t	419,791	1	419,791	85,74	0,0115
C ²	143,351	1	143,351	29,28	0,0325
Falta de ajuste	184,926	10	18,493	3,78	0,2274
Error puro	9,793	2	4,896		
Total	3474,090	16			

El ajuste obtenido mediante regresión múltiple a una función cuadrática (ecuación [7.4]) se muestra a continuación, incluyendo el coeficiente de correlación R², el error estándar y el error medio absoluto de dicho ajuste.

Grado de deslignificación (%)
$\text{GD (\%)} = -197,88 + 2,99284C + 0,915013T + 0,221769t - 0,0331703C^2$
R ² = 94,39 %
Error estándar de la estimación = 2,213
Error medio absoluto = 2,954

Para confirmar la bondad del ajuste del modelo obtenido, se representan los valores de deslignificación experimental frente a los valores predichos por el modelo en la Figura 7.7.

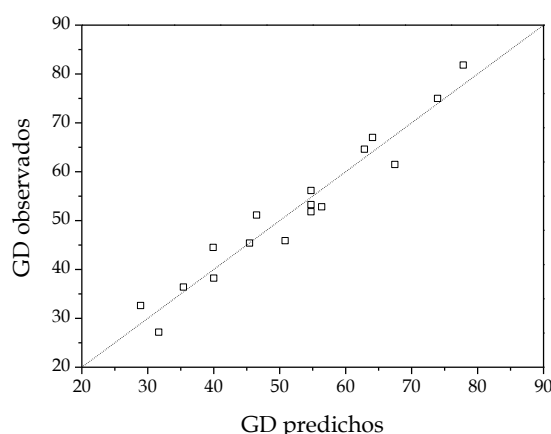


Figura 7.7. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para GD (%).

Los mapas de contorno obtenidos al emplear la ecuación [7.4], manteniendo fija la tercera variable independiente en su valor central del diseño (50 % de etanol, 75 min y 185 °C) se muestra en la Figura 7.8.

En la Figura 7.8a, se presenta el mapa de contorno del grado de deslignificación para una concentración de etanol del 50 %. La mayor intensidad del tratamiento, proporcionada por el incremento de la temperatura y el tiempo, permite alcanzar el mayor grado de deslignificación de los sólidos tratados. En las condiciones más suaves (170 °C y 50 min) se obtiene un grado del 37 % que se incrementa hasta un 72 % bajo las condiciones experimentales más severas (200 °C y 100 min), empleando la concentración de alcohol (50 %).

Los valores más altos de grado de deslignificación se relacionan con las condiciones de operación más elevadas de temperatura y tiempo estudiadas. Otros estudios del proceso organosolv sobre materiales lignocelulósicos llegaron a similares conclusiones. Wildschut y col. (2013), bajo condiciones fijas de 60 min y 60 % de etanol, obtuvieron el mayor porcentaje de deslignificación en paja de trigo (75,8 %) a 210 °C de temperatura. Romaní y col. (2013) alcanzaron un 77,3 % de deslignificación en madera de eucalipto al aplicar 200 °C en un proceso organosolv con 80 % de glicerol y 65 min de reacción. Huijgen y col. (2010) al estudiar tiempo y temperatura de forma independiente en la deslignificación de paja de trigo, consiguieron la mayor eliminación de lignina a los 120 min y 205 °C.

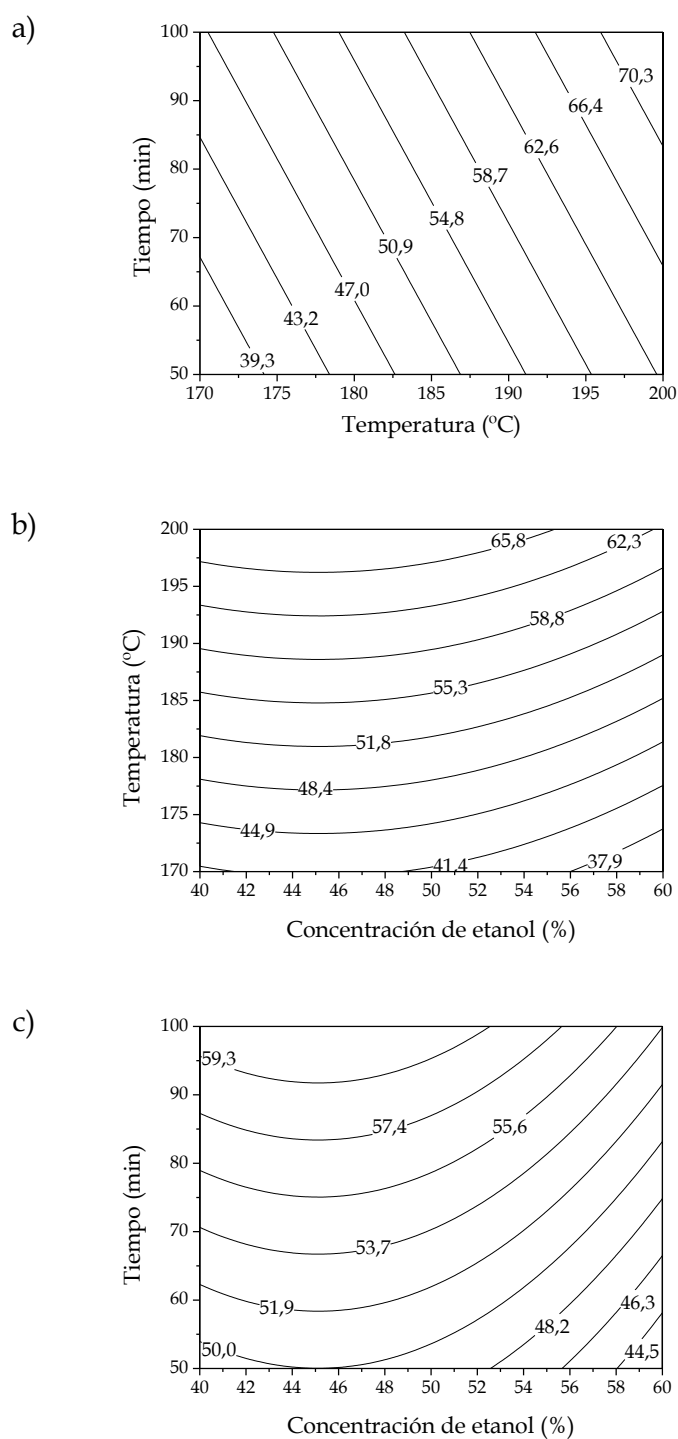


Figura 7.8. Mapa de contorno de GD (%): a) $C_{EtOH} = 50 \%$, b) $t = 75 \text{ min}$ y c) $T = 185 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

El comportamiento observado con el incremento de la intensidad de tratamiento en la despolimerización y solubilización de lignina del sólido es semejante al que se produce en la eliminación de hemicelulosas. La temperatura y el tiempo de operación más elevados favorecen la rotura de los enlaces, tanto de la lignina como de la

hemicelulosa, pero también de los enlaces intermoleculares que los unen. Los enlaces covalentes, tipo α -éster y fenil glucosídico, que forman parte del denominado complejo lignina-carbohidratos (*LCC, lignin-carbohydrate complex*) se rompen previo a la eliminación de la lignina de la biomasa (Heriksoon y col., 2010).

La selección del porcentaje de etanol más adecuado para obtener la mayor eliminación de lignina se realiza mediante el análisis de los mapas de contorno a 75 min y 185 °C de tratamiento (Figura 7.8b y Figura 7.8c). Fijando la variable independiente del eje Y en 185 °C para la Figura 7.8b, se observa que el grado de deslignificación alcanzado es de 55 %, cuando el porcentaje de etanol en el disolvente es de un 45 %, mientras que se reduce hasta un 48 % cuando el disolvente presenta una concentración del 60 %. Del mismo modo, al fijar la variable del eje Y en la Figura 7.8c en 75 min, el porcentaje de alcohol que presenta un mayor grado de deslignificación es el de 45 %, alcanzando así un valor de 56 %. Por tanto, un 45 % de concentración de etanol en el disolvente de partida da lugar a grados de deslignificación más altos.

La concentración de alcohol en el disolvente de partida influye sobre los dos efectos que se producen en la lignina durante el proceso organosolv, su despolimerización y su solubilización. A bajas concentraciones de etanol, el mayor contenido en agua en el disolvente da lugar a la mayor concentración de iones hidronio. Estos producen la rotura hidrolítica de los enlaces éteres α y β de la lignina de la madera y, por tanto, su despolimerización. Sin embargo, la solubilización de esta lignina despolimerizada en agua es limitada. De forma contraria, a altas concentraciones de etanol se favorece la solubilización de la lignina. El aumento de la proporción de alcohol en el disolvente incrementa el pH del medio de reacción, es decir, reduce su actividad protónica y la rotura de los enlaces que conllevan a la fragmentación de la lignina (Pan y col., 2006a; Pan y col., 2007; Huijgen y col., 2010; Wildschut y col., 2013; Cybulska y col., 2017). Por tanto, al tratarse de un proceso no catalizado, la concentración de etanol resulta una variable fundamental en el grado de deslignificación de la madera. A la vista de los resultados obtenidos y considerando estos efectos, el mejor porcentaje de etanol es un 45 %.

Este compromiso de efectos, despolimerización y solubilización de lignina, considerados en la selección del porcentaje de etanol para la máxima deslignificación se encuentra en concordancia con otros autores. Huijgen y col. (2010) obtuvieron su máxima deslignificación de la paja de trigo, sin la adición de catalizador, en la concentración de acetona del 40 %. Wildschut y col. (2013) optaban por el intervalo entre 50-60 % de etanol al estudiar la misma materia prima. Yáñez-S y col. (2013) seleccionaron un 50 % de concentración de etanol al someter la madera de *Eucalyptus globulus* a un organosolv autocatalítico. Sin embargo, en procesos catalizados, como es el realizado por Pan y col. (2006a y 2007), donde empleaban ácido sulfúrico en el tratamiento organosolv de distintas maderas, *Pinus contorta* y *Populus nigra* x *P. maximowiczii*, su máxima eliminación de lignina se alcanzaba al usar una concentración mayor de etanol, un 65 %. Esto se debe a que la actividad protónica se favorece por la adición del ácido sulfúrico.

Los valores de los grados de deslignificación obtenidos para la madera de *Pinus radiata* en el diseño de experimentos se encuentran en el intervalo de 33 y 75 %, correspondiendo a los experimentos de condiciones de operación opuestas, ORG-4 (170 °C, 50 min y 60 % de etanol) y ORG-13 (200 °C, 100 min y 40 % de etanol). Este intervalo de deslignificación se encuentra muy próximo al obtenido por Romaní y col. (2013) al tratar madera de eucalipto en un tratamiento organosolv, empleando una mezcla glicerol/agua como disolvente, alcanzando grados de deslignificación entre 33,7 y 77,3 % ó el conseguido por Jang y col. (2016) con madera *Liriodendron tulipifera* con etanol/agua (58,3-80,2 %) en el intervalo de temperatura 130-170 °C y favorecido por la adición de ácido sulfúrico como catalizador.

La deslignificación de la madera de pino es la principal consecuencia del proceso organosolv. Esta eliminación de lignina se ve favorecida por altos tiempos y temperaturas, mientras que la concentración de etanol presenta un punto de compromiso entre los dos efectos que intervienen en dicha deslignificación, un 45 %. Esta pérdida de lignina, junto con la extracción de las hemicelulosas del sólido, justifica que los sólidos deslignificados presenten un mayor porcentaje de celulosa. Del mismo modo, también evidencia la menor cantidad de sólidos tratados.

7.1.3. Estabilidad térmica

La estabilidad térmica del sólido deslignificado obtenido en cada ensayo del diseño de experimentos del tratamiento organosolv se analiza determinando la temperatura de degradación al 10 % ($T_{10\% \text{-ORG}}$), la temperatura de degradación máxima ($T_{\text{max-ORG}}$) y las cenizas a 800 °C. Estos resultados se recogen en la Tabla 7.15.

Tabla 7.15. Parámetros de degradación térmica del sólido deslignificado.

Experimento	$T_{10\% \text{-ORG}}$ (°C)	$T_{\text{max-ORG}}$ (°C)	Cenizas a 800 °C (%)
ORG-1	286	327	19,2
ORG-2	285	340	19,8
ORG-3	306	330	18,9
ORG-4	277	333	25,3
ORG-5	279	338	25,2
ORG-6	284	338	23,8
ORG-7	287	333	27,0
ORG-8	281	330	26,0
ORG-9	286	341	24,5
ORG-10	299	349	21,6
ORG-11	282	340	23,6
ORG-12	277	336	25,3
ORG-13	306	351	21,9
ORG-14	294	346	22,6
ORG-15	281	335	25,1
ORG-16	294	345	24,5
ORG-17	286	339	24,6

La temperatura de degradación al 10 % de los sólidos deslignificados varía entre 277 y 306 °C y la temperatura de máxima degradación lo hace entre 327 y 349 °C. Con respecto al porcentaje de cenizas, éste varía entre un 19,2 y 27 % para todas las muestras del diseño organosolv. Estos resultados están en línea con los obtenidos en otros estudios de estabilidad térmica de biomasa tras emplear un tratamiento con disolventes orgánicos (Sun y col., 2015).

La respuesta que se modeliza es la temperatura de degradación al 10 % del sólido deslignificados ($T_{10\% \text{-ORG}}$), al igual que se realiza con la fase sólida obtenida en el estudio del diseño de autohidrólisis. Los efectos de los principales factores, de sus interacciones y de sus efectos cuadráticos sobre esta respuesta, junto con sus errores, se muestran en la Tabla 7.16.

Tabla 7.16. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre $T_{10\% \text{-ORG}}$.

Efecto	Valor \pm Error
C	-6,404 \pm 0,827
T	16,076 \pm 0,827
t	6,570 \pm 0,827
C ²	-0,918 \pm 0,910
CT	-3,750 \pm 1,080
Ct	-0,250 \pm 1,080
T ²	4,385 \pm 0,910
Tt	2,250 \pm 1,080
t ²	1,557 \pm 0,910
Media	285,629 \pm 0,880

El análisis de varianza para la temperatura de degradación al 10 % para el sólido deslignificado ($T_{10\% \text{-ORG}}$) se muestra en la Tabla 7.17. De nuevo, se fijan como criterios de exclusión de efectos significativos que el valor de la distribución de Fischer F sea mayor a 18,51 y el valor de P menor a 0,05.

Tabla 7.17. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre T₁₀ %-ORG.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
C	140,008	1	140,008	60,00	0,0163
T	882,333	1	882,333	378,14	0,0026
t	147,378	1	147,378	63,16	0,0155
C ²	2,374	1	2,374	1,02	0,4193
CT	28,125	1	28,125	12,05	0,0739
Ct	0,125	1	0,125	0,05	0,8385
T ²	54,203	1	54,203	23,23	0,0405
Tt	10,125	1	10,125	4,34	0,1727
t ²	6,832	1	6,832	2,93	0,2292
Falta de ajuste	49,880	5	9,976	4,28	0,2004
Error puro	4,667	2	2,333		
Total	1333,880	16			

Tras la eliminación de los efectos no significativos, en este caso, todas las interacciones CT, Ct y Tt y los efectos cuadráticos de la concentración de etanol C² y el tiempo t²; el nuevo análisis de varianza con los efectos significativos queda como se recoge en la Tabla 7.18.

Tabla 7.18. Valor y análisis de varianza de los efectos significativos sobre T₁₀ %-ORG.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
C	140,008	1	140,008	60,00	0,0163
T	882,333	1	882,333	378,14	0,0026
t	147,378	1	147,378	63,16	0,0155
T ²	58,548	1	58,548	25,09	0,0376
Falta de ajuste	100,949	10	10,095	4,33	0,2022
Error puro	4,667	2	2,333		
Total	1333,880	16			

A partir del nuevo ANOVA y teniendo en cuenta los efectos significativos (C, T, t y T²) se ajusta el modelo mediante la regresión por mínimos cuadrados, obteniendo la ecuación [7.5].

$T_{10\% \text{-ORG}} (^{\circ}\text{C})$
$T_{10\% \text{-ORG}} (^{\circ}\text{C}) = 515,413 - 0,320185C - 2,95008T + 0,131402t + 0,00942144T^2$
$R^2 = 92,08 \%$
Error estándar de la estimación = 1,527
Error medio absoluto = 2,014

[7.5]

Mediante la representación de los valores predichos por el modelo para la temperatura de degradación al 10 % y los valores experimentales (Figura 7.9) se demuestra que se encuentran distribuidos muy próximos a la diagonal (error cero).

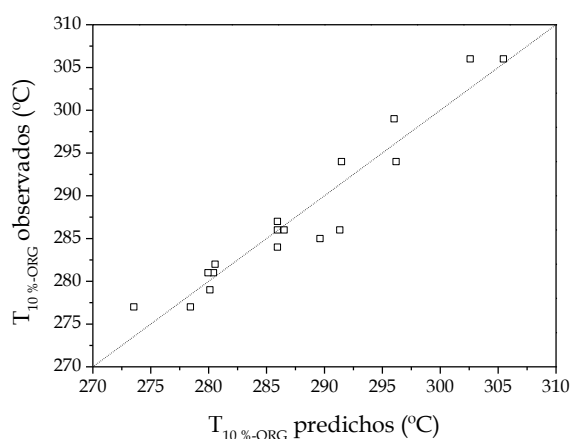


Figura 7.9. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para $T_{10\% \text{-ORG}}$ ($^{\circ}\text{C}$).

A continuación, en la Figura 7.10 se representan los mapas de contorno de esta respuesta, fijando la tercera variable en las condiciones del punto central del diseño de experimentos (50 % de etanol, 75 min y 185 $^{\circ}\text{C}$).

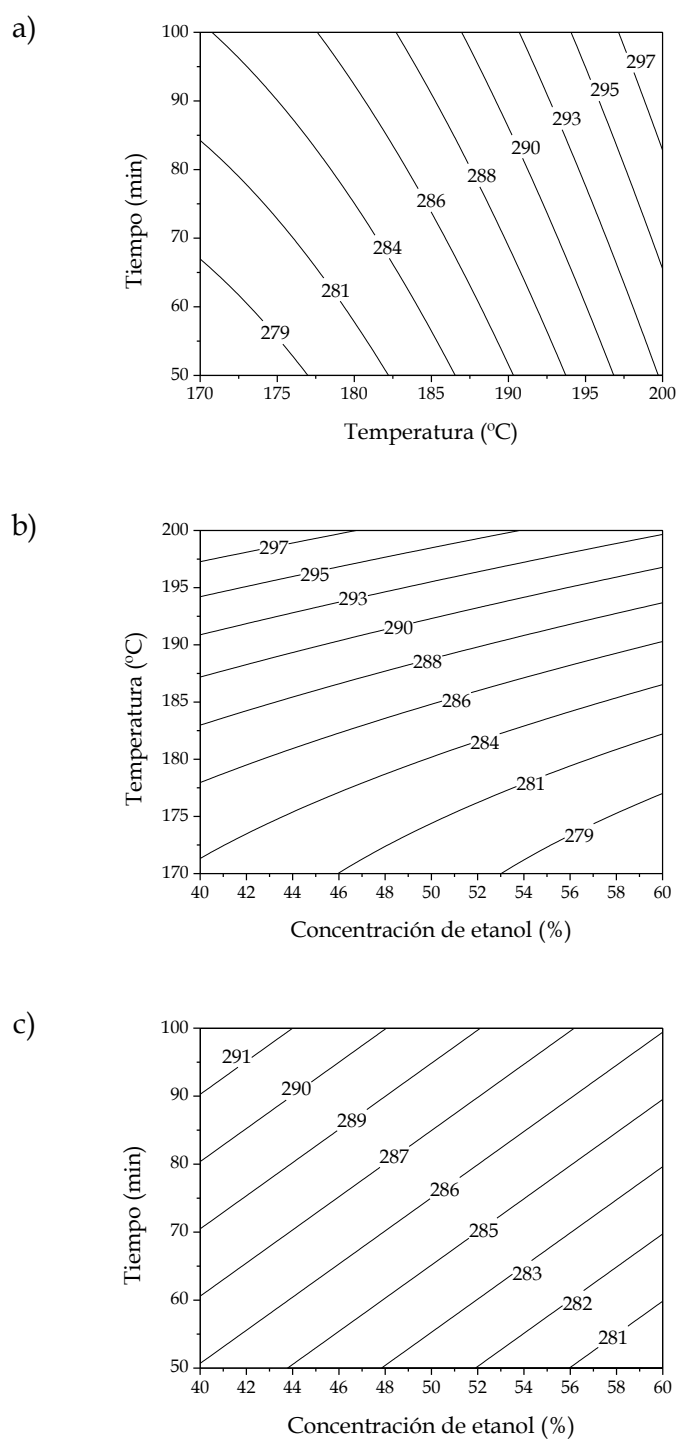


Figura 7.10. Mapa de contorno de $T_{10\%-\text{ORG}}$ (°C): a) $C_{\text{EtOH}} = 50\%$, b) $t = 75\text{ min}$ y c) $T = 185\text{ °C}$.

La temperatura de degradación al 10 % de los sólidos deslignificados se incrementa con la temperatura y tiempo de tratamiento (Figura 7.10a). De esta forma, aumenta desde los 277 °C, en sólidos obtenidos en las condiciones más suaves (170 °C y 50 min), hasta los 298 °C, en aquellos procedentes de las condiciones más severas

(200 °C y 100 min). El incremento de la concentración de alcohol en el disolvente supone una reducción de la $T_{10\% \text{-ORG}}$ (Figura 7.10b y Figura 7.10c). Por ejemplo, bajo un tiempo de reacción fijo en 50 min, el aumento del porcentaje de etanol de 40 a 60 % implica una reducción desde los 286 °C hasta 280 °C. Del mismo modo, al mantener fija la temperatura de reacción en 170 °C, $T_{10\% \text{-ORG}}$ baja desde los 284 °C al emplear un 40 % de etanol hasta los 277 °C usando un 60 % de etanol en el disolvente. Destacar la proximidad de las isolíneas al incrementar la temperatura de operación (Figura 7.10a y Figura 7.10b), lo que implica que el efecto de esta variable independiente es más acusado a valores más elevados.

Para completar el estudio de la estabilidad térmica de los sólidos deslignificados, se muestran de forma representativa las curvas de TGA y sus derivadas de cuatro muestras de sólido deslignificado del diseño organosolv, indicando los parámetros de degradación térmica estudiados. Estas muestras han sido obtenidas bajo la misma concentración de etanol (40 %) y a diferentes temperaturas y tiempos, correspondiendo a los ensayos ORG-10, ORG-13, ORG-15 y ORG-17 que se han seleccionado al considerarse los más representativos, ya que se llevan a cabo en las condiciones de operación superiores e inferiores del diseño (Figura 7.11).

En la representación de la TGA, se comprueba como la $T_{10\% \text{-ORG}}$ aumenta con la intensidad de tratamiento, siendo más acusado el efecto de la temperatura que el del tiempo. Del mismo modo, la temperatura a la cual se alcanza la máxima degradación (T_{max}) también se incrementa con la intensidad de tratamiento. Con respecto al porcentaje de cenizas, es menor en aquellos sólidos más deslignificados, lo que se puede asociar a una mayor pérdida de lignina durante el tratamiento organosolv (Sun y col., 2015).

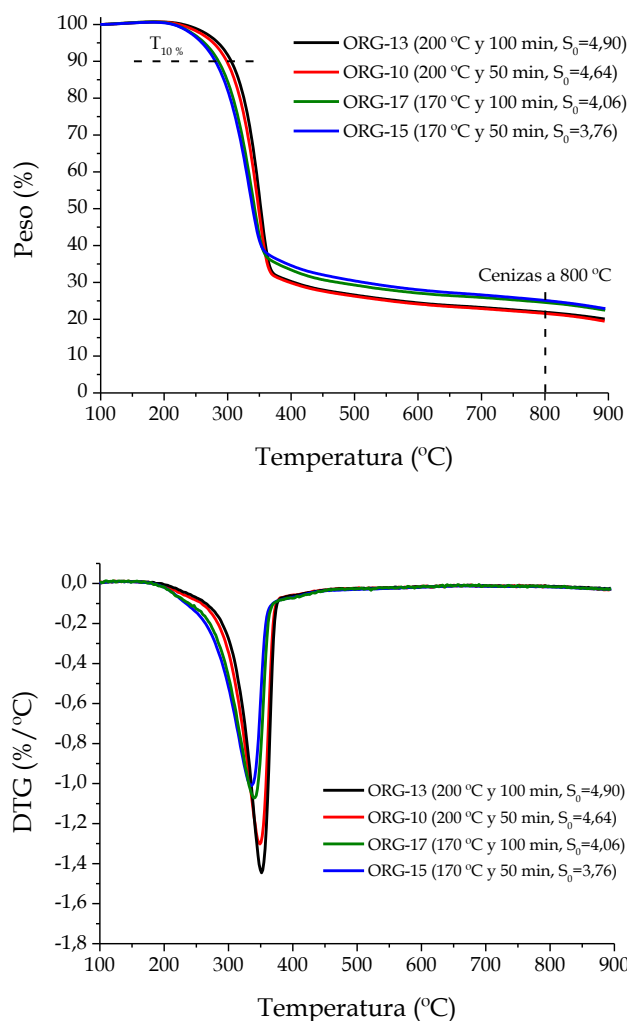


Figura 7.11. Curvas de TGA y DTG del sólido deslignificado de los ensayos ORG-10, ORG-13, ORG-15 y ORG-17 del diseño organosolv.

En la representación de las derivadas de las curvas de TGA se comprueba cómo el pico es más ancho y asimétrico en la muestra ORG-15 (170 °C y 50 min) debido al solapamiento de los picos de la hemicelulosa y celulosa (Chen y Kuo, 2010; Biswas y col., 2011). En cambio, el pico de la muestra ORG-13 (200 °C y 100 min) es más estrecho, ya que se trata de un sólido deslignificado rico en celulosa, con un contenido en la misma del 72 %. Estos resultados están en línea con los obtenidos en la caracterización de la composición de dichos sólidos (epígrafe 7.1.2).

Dado que la influencia de las condiciones experimentales sobre la respuesta modelizada ($T_{10\%-\text{ORG}}$) es similar a la que tenían sobre otras respuestas previamente analizadas (el contenido en hemicelulosas y lignina en el sólido deslignificado) se va a

relacionar estas respuestas para determinar la concordancia que presentan. Para ello, en la Figura 7.12 se representa la temperatura de degradación al 10 % del sólido deslignificado frente al sumatorio de las dos fracciones de la madera que se eliminan durante el proceso organosolv, la hemicelulosa y la lignina.

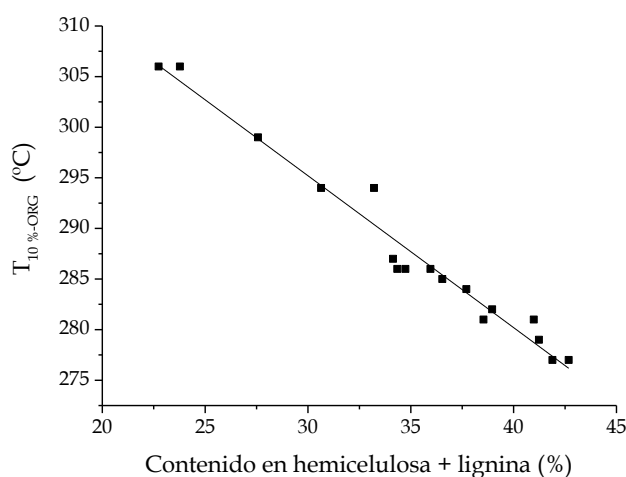


Figura 7.12. T_{10 %-ORG} (°C) frente al contenido en hemicelulosa y lignina (%) en el sólido deslignificado.

En la Figura 7.12 se observa la relación lineal que existe entre la reducción del contenido de hemicelulosas y lignina en el sólido deslignificado como consecuencia del proceso organosolv y el incremento de la estabilidad térmica de dicho sólido. Por tanto, el análisis de TGA muestra que la estabilidad térmica del sólido deslignificado está condicionada por las fracciones amorfas que se eliminan durante el proceso organosolv. De nuevo se confirma que el parámetro de degradación térmica, T₁₀ %, de los sólidos tratados aporta información sobre la extracción de las fracciones amorfas durante el tratamiento, tal y como ocurría en el estudio del tratamiento de autohidrólisis (epígrafe 6.1.3).

7.1.4. Grupos funcionales

El sólido deslignificado de los diferentes ensayos del diseño de experimentos para estudiar el proceso organosolv se analiza mediante espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR). Para analizar los resultados obtenidos mediante esta técnica, se toman cuatro muestras del diseño como representativas: ORG-4, ORG-13, ORG-14 y ORG-15. Las condiciones experimentales de estos ensayos corresponden a

los niveles mínimos y máximos de las variables independientes del diseño organosolv. En la Figura 7.13 se muestran sus espectros de FTIR, ordenados por factor severidad del tratamiento y porcentajes de etanol. El resto de espectros se muestran en el Anexo de la memoria.

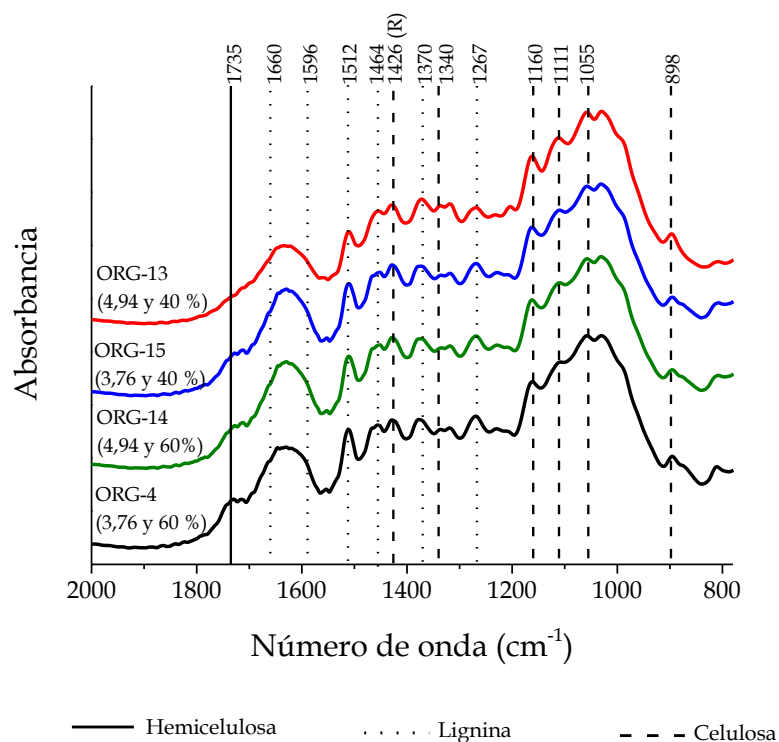


Figura 7.13. Espectros de FTIR de los sólidos deslignificados del diseño organosolv: ORG-4, ORG-13, ORG-14 y ORG-15.

Las bandas de hemicelulosa, celulosa y lignina señaladas en los espectros se detallan en la Tabla 5.10, donde se identifican a que grupos funcionales corresponden.

El cambio más significativo es el producido en la banda de 1512 cm^{-1} , correspondiente a la vibración del anillo aromático de la lignina. La intensidad de esta banda se reduce con incremento de la severidad de tratamiento y con la disminución del porcentaje de etanol, debido a la deslignificación de la madera que se produce durante el tratamiento organosolv. Para confirmar la reducción de dicha banda, se realiza un análisis semicuantitativo tomando como banda de referencia la correspondiente a 1426 cm^{-1} (Sun y col., 2014c). Los resultados del análisis semicuantitativo para cada experimento del diseño se muestran en la Tabla 7.19.

Tabla 7.19. Análisis semicuantitativo FTIR de los sólidos deslignificados.

Experimento	A_{1512}/A_{1426}
ORG-1	0,8757
ORG-2	0,8595
ORG-3	0,7250
ORG-4	0,9179
ORG-5	0,8797
ORG-6	0,8257
ORG-7	0,8086
ORG-8	0,8383
ORG-9	0,8342
ORG-10	0,7396
ORG-11	0,8458
ORG-12	0,8872
ORG-13	0,7705
ORG-14	0,8037
ORG-15	0,8546
ORG-16	0,8351
ORG-17	0,8416

Al emplear un mismo factor de severidad, el incremento del porcentaje de etanol supone una mayor intensidad de esta banda, ya que se produce una menor eliminación de este polímero que se mantiene en la fase sólida. Por ejemplo, el cambio de porcentaje de etanol de 40 % a 60 %, empleando el mismo factor de $S_0 = 3,76$ (170 °C y 50 min), supone el incremento de la intensidad de banda de 1512 cm^{-1} desde 0,8546 a 0,9179, correspondiente a los ensayos ORG-4 y ORG-15. Del mismo modo ocurre a condiciones de operación más severas, $S_0 = 4,94$ (200 °C y 100 min), el incremento de la concentración del alcohol en el disolvente da lugar a una intensidad de banda de la lignina más alta, pasando de 0,7705 a 0,8037 (ensayos ORG-14 y ORG-13). Como se ha comentado, este cambio está asociado a la deslignificación en la madera que se produce en dichos ensayos. En esta misma línea, se justifican las variaciones que se producen bajo condiciones fijas de etanol (50 %). El incremento de la severidad de tratamiento da lugar a la menor intensidad de dicha banda, se reduce desde $0,8872 > 0,8257 > 0,7250$ con el aumento del factor de severidad $3,64 < 4,38 < 5,11$, correspondiente a los ensayos ORG-12, ORG-6 y ORG-3. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los grados de deslignificación previamente expuestos en el apartado 7.1.2.3.

7.2. Caracterización de la lejía negra organosolv

En este epígrafe se muestra la caracterización de la lejía negra obtenida en el proceso organosolv. Dicha caracterización consiste en la determinación del valor de pH y en la cuantificación de los compuestos presente en ella, azúcares y productos de degradación.

7.2.1. Determinación del pH

El valor del pH de la lejía negra del proceso organosolv (pH_{ORG}) obtenido en cada uno de los ensayos del diseño de experimentos se muestra en la Tabla 7.20.

Tabla 7.20. Valores de pH de la lejía negra del organosolv.

Experimento	pH_{ORG}
ORG-1	3,90
ORG-2	4,64
ORG-3	4,01
ORG-4	5,08
ORG-5	4,84
ORG-6	4,42
ORG-7	4,42
ORG-8	4,48
ORG-9	4,49
ORG-10	3,93
ORG-11	4,68
ORG-12	4,63
ORG-13	3,78
ORG-14	4,40
ORG-15	4,30
ORG-16	4,42
ORG-17	4,32

En la Tabla 7.21 se recogen los valores de los efectos y sus interacciones, así como los errores de cada uno de ellos asociados al valor de pH de la lejía negra del proceso organosolv (pH_{ORG}).

Tabla 7.21. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre pH_{ORG}.

Efecto	Valor \pm Error
C	0,577 \pm 0,022
T	-0,415 \pm 0,022
t	-0,104 \pm 0,022
C ²	-0,080 \pm 0,024
CT	0,008 \pm 0,029
Ct	-0,088 \pm 0,029
T ²	-0,059 \pm 0,024
Tt	-0,043 \pm 0,029
t ²	0,033 \pm 0,024
Media	4,439 \pm 0,023

En la Tabla 7.22 se muestra el análisis de varianza de todos los efectos sobre el pH de la lejía negra, en el que se obtiene los efectos significativos sobre esta variable que son los correspondientes a las variables principales: concentración de etanol (C), temperatura (T) y tiempo (t).

Tabla 7.22. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre pH_{ORG}.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
C	1,138	1	1,138	696,57	0,0014
T	0,588	1	0,588	359,73	0,0028
t	0,037	1	0,037	22,66	0,0414
C ²	0,018	1	0,018	11,12	0,0794
CT	0,000	1	0,000	0,07	0,8175
Ct	0,015	1	0,015	9,37	0,0922
T ²	0,010	1	0,010	6,02	0,1336
Tt	0,004	1	0,004	2,21	0,2753
t ²	0,003	1	0,003	1,86	0,3056
Falta de ajuste	(0,064) 0,119	(5) 11	(0,013) 0,011	(7,83) 6,60	(0,1171) 0,1388
Error puro	0,003	2	0,002		
Total	1,884	16			

(): Valores para la falta de ajuste del análisis de varianza inicial

Se comprueba que la falta de ajuste resultante del modelo es 0,1388, es decir, mayor a 0,05 lo que confirma que el modelo obtenido representa adecuadamente los resultados experimentales. Dicho modelo para la lejía negra organosolv se muestra en

la ecuación [7.6], junto con el coeficiente de correlación R^2 , el error estándar y el error medio absoluto.

pH _{ORG}
$\text{pH}_{\text{ORG}} = 5,66766 + 0,0288632C - 0,013828T - 0,0020822t$
$R^2 = 93,53 \%$
Error estándar de la estimación = 0,040
Error medio absoluto = 0,065

De nuevo, para confirmar la bondad del ajuste se representan en la Figura 7.14, los valores de pH medidos frente a los valores predichos por éste. Se puede apreciar que los puntos están muy próximos a la diagonal (error cero), implicando pues una buena concordancia entre ambos pares de valores.

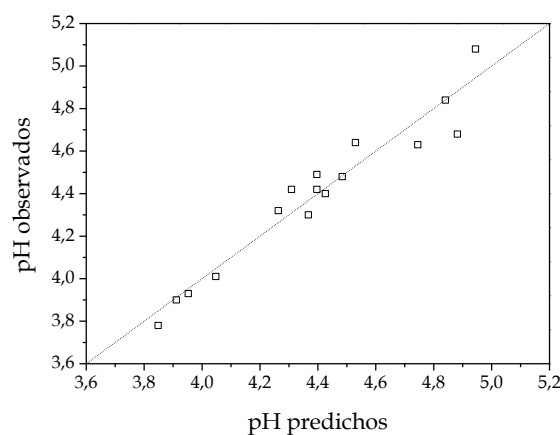


Figura 7.14. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para pH_{ORG}.

A partir del modelo obtenido, se presentan en la Figura 7.15 los mapas de contorno fijando las variables de concentración de etanol, tiempo y temperatura en las condiciones centrales del diseño (50 %, 75 min y 185 °C).

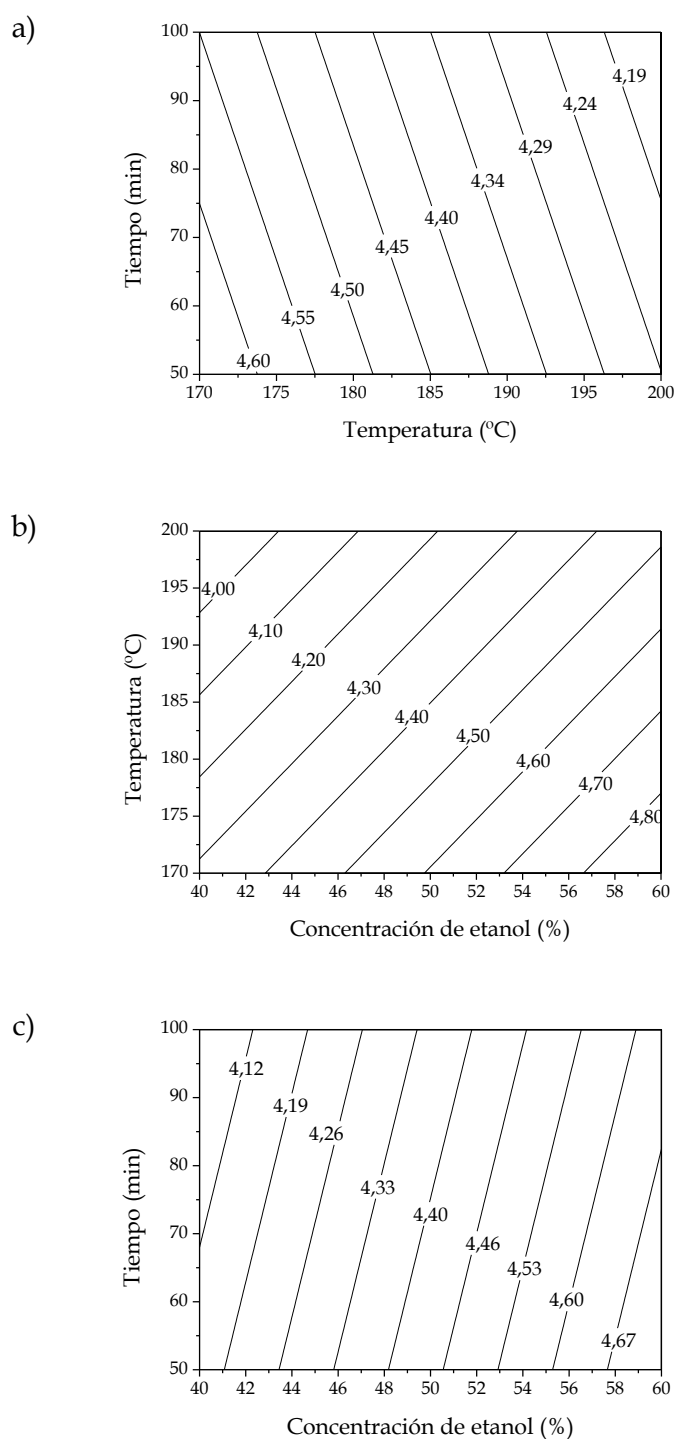


Figura 7.15. Mapa de contorno de pH_{ORG} : a) $C_{\text{EtOH}} = 50\%$, b) $t = 75\text{ min}$ y c) $T = 185\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En la Figura 7.15a se observa la reducción de los valores de pH de la lejía negra con el incremento de la intensidad de tratamiento, bien tiempo o temperatura. La caída del pH se debe a la solubilización y degradación de las hemicelulosas en la lejía negra que han sido previamente eliminadas de la madera, tal y como se cuantificó en el

apartado 7.1.2.2. Bajo condiciones más suaves de operación, la acidez se debe a la formación del ácido acético generado por la solubilización de los grupos acetilo de las hemicelulosas (Moniz y col., 2013; Batalha y col., 2015). A medida que se incrementan las condiciones de operación, las hemicelulosas que ya han sido fragmentadas y se encuentran solubilizadas en la lejía negra se degradan. Estas reacciones de degradación dan lugar a furanos, pero también conllevan a otros ácidos orgánicos, como el ácido fórmico, que contribuyen a esta caída de pH. Por ello, bajo condiciones más severas de tratamiento, los valores de pH son menores, debido tanto a los ácidos generados directamente de la hemicelulosa (ácido acético) como a los procedentes de la degradación de las mismas (ácido fórmico).

La influencia de la concentración de etanol se observa en la Figura 7.15b y Figura 7.15c. Se comprueba que las concentraciones más elevadas de etanol se traducen en mayores valores de pH de la lejía negra, hecho asociado al pH inicial del disolvente de partida. Los valores de pH medidos en la lejía negra, todos dentro del intervalo 3,8-5,1, son similares a los obtenidos por Wildschut y col. (2013) quienes también operaban con mezclas etanol/agua como disolvente.

Los valores de pH de la lejía negra obtenida en los diferentes ensayos del diseño de experimentos del tratamiento organosolv permiten conocer la concentración de protones en el medio. Como se ha comentado en apartados anteriores, estos protones son los responsables de la rotura de los enlaces de la hemicelulosa y la lignina. Por ello, cuando el pH del medio se reduce, también lo hace el contenido de hemicelulosas y lignina en el sólido deslignificado, ya que se produce una mayor despolimerización y eliminación de estas fracciones. Por tanto, se confirma la relación existente entre el valor de pH de la lejía negra y las respuestas analizadas previamente, como la deslignificación, la extracción de la fracción hemicelulósica de la madera o la cantidad de sólidos resultantes tras el tratamiento.

7.2.2. Contenido de azúcares y productos de degradación

La lejía negra de los ensayos del diseño del proceso organosolv presenta tanto monosacáridos (glucosa, Gl, xilosa-manosa-galactosa, X-M-Ga, y arabinosa, A) como productos de degradación (ácido acético, AA, ácido fórmico, AF, hidroximetilfurfural, HMF, y furfural, F). La concentración de estos compuestos se recoge en la Tabla 7.23.

Tabla 7.23. Concentración de monosacáridos y productos de degradación de la lejía negra de los ensayos del diseño organosolv (g/L).

Experimento	Gl	X-M-Ga	A	AF	AA	HMF	F
ORG-1	0,38	1,41	0,76	0,49	0,76	0,21	0,17
ORG-2	0,12	0,35	0,51	0,55	1,04	0,03	0,02
ORG-3	0,49	1,11	0,33	0,49	1,34	0,92	0,07
ORG-4	-	0,15	0,90	0,19	0,36	-	0,01
ORG-5	-	0,14	0,77	0,24	0,42	0,06	0,01
ORG-6	0,04	0,31	0,58	0,30	0,52	0,12	0,04
ORG-7	0,03	0,35	0,51	0,26	0,45	0,15	0,08
ORG-8	0,02	0,24	0,84	0,20	0,35	0,10	0,01
ORG-9	0,03	0,35	0,67	0,32	0,55	0,16	0,02
ORG-10	1,07	3,62	0,63	0,41	0,12	1,33	0,03
ORG-11	0,01	0,16	0,55	0,25	0,62	0,19	0,01
ORG-12	0,02	0,10	0,70	0,18	0,32	0,06	-
ORG-13	1,09	2,80	0,89	1,52	2,66	1,58	0,08
ORG-14	0,33	0,70	0,35	0,74	1,39	0,46	0,04
ORG-15	0,09	0,27	0,97	0,28	0,42	0,13	0,01
ORG-16	0,22	0,76	0,75	0,72	1,21	0,26	0,02
ORG-17	0,11	0,53	1,03	0,53	0,53	0,16	0,03

-: no detectado

Los datos del análisis de la fase líquida reflejan la presencia de la arabinosa desde las condiciones experimentales más suaves. Ello está en concordancia con los resultados obtenidos en la caracterización del sólido deslignificado (epígrafe 7.1.2). Además, la concentración de arabinosa presenta una tendencia decreciente a medida que se incrementa la severidad del tratamiento. Por ejemplo, en los experimentos ORG-4 y ORG-14, ambos realizados bajo un 60 % de etanol, esta concentración se reduce desde 0,90 g/L a 0,35 g/L al incrementar la temperatura de 170 °C a los 200 °C. Lo mismo ocurre en los experimentos ORG-3 y ORG-12, llevados a cabo en 50 % de etanol, al pasar de 160 °C a 210 °C, la concentración de arabinosa baja de 0,70 g/L a

0,33 g/L. Estos resultados confirman que esta pentosa, tras su liberación, se degrada en la fase líquida dando lugar a su producto de degradación, el furfural. Este mismo comportamiento también fue observado por Pan y col. (2007) al tratar otra madera blanda, *Pinus contorta*, en un proceso organosolv etanol/agua catalizado con ácido sulfúrico.

La concentración de los monosacáridos procedentes de la hemicelulosa (xilosa, galactosa y manosa) es mayor que la del monómero que conforma la celulosa (glucosa), ya que se trata de un polímero con una estructura más amorfa y fácilmente hidrolizable (Ruiz y col., 2012). La baja concentración de glucosa medida en la lejía negra es coherente con el contenido de celulosa cuantificado en los sólidos deslignificados (epígrafe 7.1.2), lo que supone que durante el tratamiento organosolv, la hidrólisis de los enlaces de la celulosa es reducida y, por tanto, la liberación de sus monómeros de glucosa a la fase líquida también lo es. La concentración más alta de glucosa se obtiene en aquellos experimentos donde la temperatura es mayor (200 °C) y la concentración de etanol es menor (40 %), ORG-10 y ORG-13, con 1,07 y 1,09 g/L, respectivamente. Este hecho se justifica por la elevada concentración de protones en el medio de reacción en esas condiciones, como se comprobó con la medida de pH (epígrafe 7.2.1), que genera la rotura hidrolítica del enlace glucosídico mediante el cual se unen los monómeros de glucosa, permitiendo así, su solubilización a la lejía negra. En este sentido, es lógico que la glucosa no sea cuantificable en aquellos experimentos realizados al 60 % de etanol y la temperatura igual a 170 °C (ORG-4 y ORG-5), donde el pH del medio era más elevado. Por tanto, la hidrólisis de la celulosa de la madera de pino durante el organosolv autocatalítico es reducida, hecho que ha sido también observado en otro tipo de materia prima en procesos realizados bajo ausencia de catalizador (Huijgen y col., 2010).

Con respecto a la concentración de xilosa, manosa y galactosa presenta una tendencia creciente según se incrementa la intensidad del tratamiento y se reduce con el porcentaje de etanol empleado como disolvente. De esta forma, con el incremento de temperatura de 170 °C a 200 °C, ensayos ORG-17 y ORG-13 (40 % de etanol y 100 min), se incrementa su concentración de 0,53 a 2,80 g/L; mientras que en los ensayos ORG-13 y ORG-14 (200 °C y 100 min), correspondiendo a un 40 % y un 60 % de etanol, la

concentración de azúcares pasa de 2,80 a 0,70 g/L. De nuevo, se observa la misma tendencia con las variables independientes que en otras respuestas. El incremento de severidad da lugar a una mayor hidrólisis de los enlaces de las hemicelulosas que produce su despolimerización y solubilización a la fase líquida (lejía negra). Del mismo modo, una mayor acidez del medio de reacción, proporcionada por una concentración menor del etanol, favorece estas reacciones de despolimerización de las hemicelulosas de la madera. La influencia de las condiciones de operación sobre los azúcares en la lejía negra está acorde a las observadas por Huijgen y col. (2010), donde la concentración de disolvente de partida, en este caso acetona/agua, resultaba un factor condicionante en la hidrólisis de la hemicelulosas.

En relación a la concentración de los ácidos medidos en la lejía negra, la concentración de ácido acético es mayor en todos los casos que la de ácido fórmico, alcanzando 2,66 g/L y 1,52 g/L, respetivamente. Este hecho se debe a que el ácido acético procede de la liberación de los grupos acetilo de la hemicelulosa, mientras que el ácido fórmico proviene de los productos de degradación hidroximetilfurfural (HMF) y furfural, como se recoge en el esquema de la Figura 3.4 (Marzioletti y col., 2008). De forma general, el incremento de concentración de estos ácidos se produce con el incremento de la intensidad de tratamiento. A modo de ejemplo, empleando un 60 % de etanol, al incrementar la temperatura de 170 a 200 °C (experimentos ORG-4 y ORG-14), se produce una subida en la concentración del ácido acético de 0,36 g/L a 1,39 g/L, a la par que lo hace el ácido fórmico desde 0,19 g/L a 0,71 g/L. Sin embargo, al mantener fijas las condiciones de temperatura y tiempo (ORG-13 y ORG-14, 200 °C y 100 min), una concentración en el alcohol del 40 % supone una concentración de ácido acético y fórmico de 1,52 g/L y 2,66 g/L, que se reduce al incrementar la concentración de etanol hasta el 60 %, llegando a una concentración 0,74 g/L y 1,39 g/L, respetivamente. En el caso del ácido acético, la variación de su concentración se debe a la reacción de autoionización del agua que genera los iones que fomentan la rotura de los grupos acetilo de la hemicelulosa, permitiendo su solubilización en forma de dicho ácido. Por tanto, la menor proporción de alcohol en el disolvente de partida genera una mayor concentración de agua y, por ende, de protones que justifican la concentración de ácido acético mayor. Para la formación del ácido fórmico, se requiere la degradación de las hemicelulosas ya solubilizadas. Por ello, las condiciones de operación que dan

lugar a la liberación de las hemicelulosas a la fase líquida, también favorecen la degradación de los azúcares monoméricos a sus furanos correspondientes e, incluso, la conversión de éstos a ácido fórmico.

Como se ha comentado, las condiciones de operación más severas y las concentraciones de etanol bajas favorecen la despolimerización de las hemicelulosas y su solubilización en la lejía negra. Además, estas hemicelulosas solubilizadas también sufren reacciones secundarias de degradación que dan lugar a compuestos como el furfural, prodecente de las pentosas, e hidroximetilfurfural, procedente de las hexosas. Por ello, en la Tabla 7.23, se puede apreciar que, en el intervalo estudiado, y bajo las condiciones de operación más severas (ensayo ORG-13, 200 °C, 100 min y 40 % de etanol), se alcanza la concentración más alta de HMF, 1,58 g/L, y de furfural, 0,08 g/L. Destacar que la concentración de HMF es superior a la de furfural en todos los experimentos llevados a cabo, ya que los monómeros principales que componen la hemicelulosa de la madera de pino son hexosas, cuya degradación en la fase líquida genera este compuesto (HMF). Esta tendencia es contraria a la encontrada por otros autores que trabajan en procesos organosolv con otras materia primas, como paja de trigo, bagazo de caña de azúcar o madera de bambú, ya que el principal monómero de este tipo de materias primas es una pentosa, la xilosa (Huijgen y col., 2010; Li y col., 2012; Wildschut y col., 2013; Zhang y Wu, 2014). Por ejemplo, Zhang y Wu (2014) estudiaron el tratamiento organosolv en bagazo de caña de azúcar, cuya composición inicial presentaba alrededor de 22 % de xilano. Bajo unas condiciones de operación de 190 °C y 90 min y una relación sólido/líquido de 1/8, se obtenían concentraciones de furfural de hasta 0,76 g/L, mientras que de HMF sólo se alcanzaban 0,03 g/L en la lejía negra.

La extracción de hemicelulosas de la madera de pino que se produce durante el tratamiento organosolv, previamente identificada en la caracterización del sólido deslignificado, ha sido confirmada en la cuantificación de los azúcares y productos de degradación de la lejía negra. Se ha comprobado que un incremento en la intensidad de tratamiento, además de una mayor despolimerización y solubilización de las hemicelulosas, también conlleva la degradación de las mismas en la fase líquida dando lugar a sus productos de degradación correspondientes.

7.3. Caracterización de la lignina organosolv

En este último apartado del capítulo se muestran los resultados obtenidos sobre la lignina organosolv precipitada a partir de la lejía negra de cada ensayo del diseño de experimentos. Dicha lignina se cuantifica y se caracteriza analizando la distribución de pesos moleculares por GPC y la estabilidad térmica por TGA.

7.3.1. Cuantificación

Los resultados de la precipitación de la lignina organosolv se muestran en la Tabla 7.24, expresados como masa recuperada a partir de 100 g de materia prima (madera de pino) y como porcentaje de recuperación de lignina extraída (R_{LP-ORG}).

Tabla 7.24. Resultados de la lignina organosolv precipitada.

Experimento	Lignina precipitada (g/100 g madera)	R_{LP-ORG} (%)
ORG-1	1,67	13,7
ORG-2	3,85	27,4
ORG-3	6,82	31,3
ORG-4	0,25	2,9
ORG-5	1,54	15,1
ORG-6	4,60	33,4
ORG-7	4,58	30,7
ORG-8	1,17	9,7
ORG-9	4,56	32,2
ORG-10	3,81	22,2
ORG-11	1,52	12,8
ORG-12	0,58	8,1
ORG-13	3,46	17,3
ORG-14	6,58	40,2
ORG-15	0,29	3,0
ORG-16	5,60	31,4
ORG-17	0,69	5,1

Los valores de lignina precipitada varían entre 0,25 y 6,82 g por 100 g de materia prima (*Pinus radiata*). Estos resultados son inferiores a los datos bibliográficos presentados por otras materias primas. Cybulska y col. (2017) empleando hierbas y pajas de trigo, alcanzaron una recuperación que se encontraba entre 10 y 12 g; Audu y

col. (2012) al emplear una mezcla etanol/agua con ácido para tratar la hierba *Typha capensi* recuperaron entre 5,80 y 11,34 g y Pan y col. (2006b) al someter a una madera de álamo (*Populus nigra* x *P. maximowiczii*) a un proceso organosolv catalizado consiguieron recuperar entre 1,7 y 20,9 g de lignina. Los factores que influyen en el grado de deslignificación y motivan esta inferioridad de cantidad de lignina organosolv recuperada en este trabajo, frente a los datos bibliográficos, son la diferencia del tipo de materia prima de partida y el empleo del catalizador ácido.

La primera diferencia entre las distintas materias primas es el mayor contenido en lignina que presentan las maderas blandas o coníferas (25-35 %) frente a otro tipo de materiales lignocelulósicos como las maderas duras o frondosas (20-30 %), el bagazo (15-25 %) o la paja de trigo (12-16 %) (Windeisen y Wegener, 2010; Putro y col., 2016). Otra de las diferencias existentes son los tipos de enlaces que unen las unidades monoméricas de la lignina. Las maderas duras, como el álamo, presentan en su estructura un mayor porcentaje de enlaces de tipo β -O-4 más fáciles de romper durante el tratamiento (50-60 %) frente a las maderas blandas, como la empleada en este trabajo, (40-50 %). Además, las maderas duras contienen una menor proporción de enlaces más estables tipo carbono-carbono, un 3 % de enlaces 5-5 frente al 13 % presente en las maderas blandas (Heriksoon y col., 2010). También, la unidad predominante en las ligninas de las maderas de conífera es el guayacilo que, debido a los carbonos de su anillo aromático sin sustituir, tiende a las reacciones de recondensación (Hosseinaei y col., 2016). Estas diferencias implican que la deslignificación resulte más complicada en el caso de las maderas blandas y, por tanto, se recupere menor cantidad de lignina precipitada.

Otro factor que da lugar a mejores resultados es la adición del catalizador, ya que produce el incremento de la concentración de protones en el medio que generan la rotura de los enlaces que unen los monómeros de la lignina. Por tanto, favorece la deslignificación de la biomasa lignocelulósica y la consecuente mayor recuperación de lignina precipitada organosolv.

A continuación se exponen los resultados del modelo ajustado para la recuperación de la lignina organosolv. En la Tabla 7.25 se presentan los valores de los

efectos de las variables independientes, sus interacciones y los efectos cuadráticos. Asimismo se recogen los valores de los errores estándar.

Tabla 7.25. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre R_{LP-ORG} .

Efecto	Valor \pm Error
C	5,361 \pm 0,730
T	17,602 \pm 0,730
t	8,615 \pm 0,730
C ²	-13,449 \pm 0,803
CT	4,580 \pm 0,953
Ct	6,950 \pm 0,953
T ²	-8,899 \pm 0,803
Tt	-1,580 \pm 0,953
t ²	-8,294 \pm 0,803
Media	32,097 \pm 0,777

En la Tabla 7.26 se muestra el análisis de varianza de todos los efectos sobre la recuperación de la lignina. En este ANOVA se obtiene que todos los efectos son significativos excepto la interacción del tiempo y la temperatura (Tt), ya que presenta una F igual a $2,75 < 18,51$ y una P con valor de $0,2392 > 0,05$, es decir, cumple con los criterios de exclusión propuestos.

Tabla 7.26. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre R_{LP-ORG} .

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
C	98,109	1	98,109	53,99	0,0180
T	1057,790	1	1057,790	582,15	0,0017
t	253,385	1	253,385	139,45	0,0071
C ²	509,783	1	509,783	280,56	0,0035
CT	41,953	1	41,953	23,09	0,0407
Ct	96,605	1	96,605	53,17	0,0183
T ²	223,187	1	223,187	122,83	0,0080
Tt	4,993	1	4,993	2,75	0,2392
t ²	193,891	1	193,891	106,71	0,0092
Falta de ajuste	(169,006)	(5)	(33,801)	(18,60)	(0,0518)
	173,998	6	28,9997	15,96	0,0601
Error puro	3,634	2	1,817		
Total	2343,490	16			

(): Valores para la falta de ajuste del análisis de varianza inicial

Tras la exclusión de esta interacción, el modelo presenta una falta de ajuste de 0,0601 (mayor a 0,05) lo que denota que dicho modelo representa adecuadamente a los resultados experimentales. La ecuación [7.7] se muestra a continuación junto con el coeficiente de correlación R^2 , el error estándar y el error medio absoluto.

$R_{LP-ORG} (\%)$
$R_{LP-ORG} (\%) = -791,674 + 3,12579C + 7,14021T + 0,472613t$ $- 0,067246C^2 + 0,0152667CT + ,0139Ct - 0,0197752T^2 - 0,00663545C^2 \quad [7.7]$ $R^2 = 92,42 \%$ $\text{Error estándar de la estimación} = 1,348$ $\text{Error medio absoluto} = 2,919$

Para confirmar la bondad del ajuste, los valores de recuperación de lignina experimental frente a los predichos por éste se representan en la Figura 7.16. Se puede apreciar que los puntos están muy próximos a la diagonal (error cero), implicando así, una buena concordancia entre ambos pares de valores.

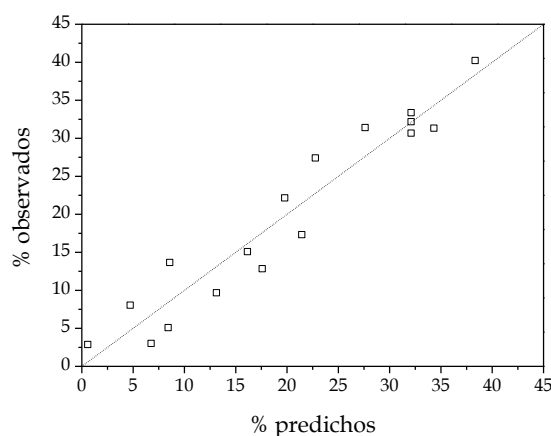


Figura 7.16. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para $R_{LP-ORG} (\%)$.

A partir del modelo obtenido, se representan los mapas de contorno fijando las variables de concentración de etanol y tiempo en las condiciones centrales del diseño, es decir, 50 % y 75 min, respectivamente (Figura 7.17).

La recuperación de lignina precipitada se incrementa con el aumento de la temperatura y el tiempo, dentro de los intervalos estudiados. Una tendencia en línea a la presentada por la deslignificación de la madera de pino. Del mismo modo que

ocurría al incrementar la severidad de tratamiento en otros procesos organosolv empleando mezclas de disolvente acetona/agua o etanol/agua en diferentes materiales lignocelulósicos (Hallac y col., 2010a; Huijgen y col., 2010).

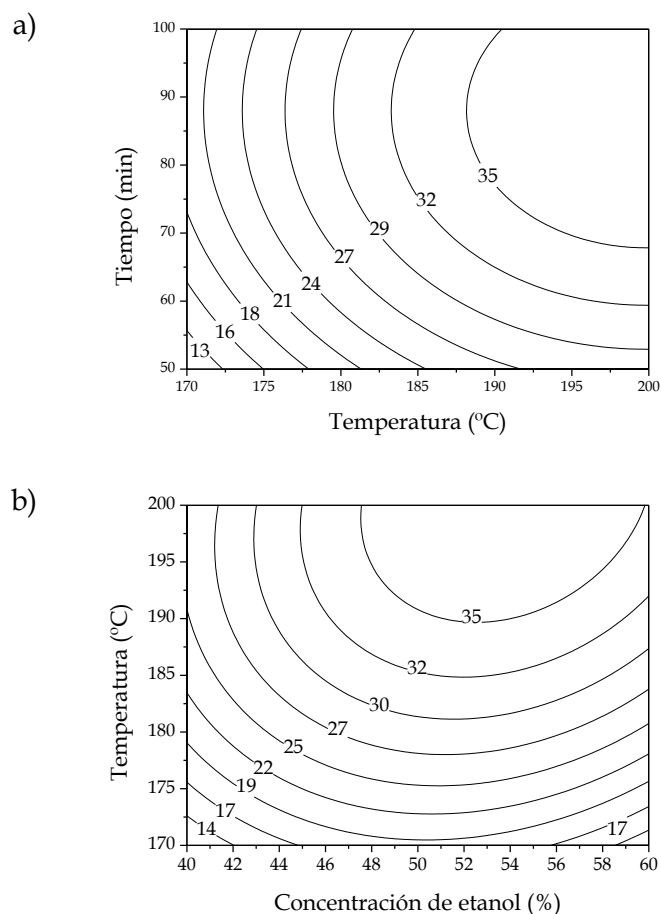


Figura 7.17. Mapa de contorno de la R_{LP-ORG} (%): a) $C_{EtOH} = 50$ % y b) $t = 75$ min.

El máximo de recuperación de lignina se encuentra entre el 52 y 56 % de la concentración de etanol. Esta tendencia se debe a que el incremento de porcentaje de etanol favorece la solubilidad de la lignina extraída y, por tanto, su recuperación por precipitación. Pan y col. (2006a) lo hicieron a la concentración de 65 % de etanol, dentro de su intervalo 25-75 %, al tratar madera de álamo con etanol/agua y Hallac y col. (2010a) alcanzaban la máxima recuperación de lignina al emplear 50 % de acetona, dentro del intervalo 25-60 %, para paja de trigo.

7.3.2. Distribución de pesos moleculares

El análisis por cromatografía de permeación en gel (GPC) de las muestras se recoge en la Tabla 7.27. Los parámetros característicos de la lignina organosolv de los diferentes ensayos del diseño obtenidos en este análisis son el peso molecular medio en peso (M_w) y en número (M_n) y la polidispersidad (M_w/M_n).

Tabla 7.27. Parámetros obtenidos por GPC de la lignina organosolv.

Experimento	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	Polidispersidad
ORG-1	3350	259	12,9
ORG-2	8216	713	11,5
ORG-3	3358	263	12,7
ORG-4	10767	374	28,8
ORG-5	7278	650	11,2
ORG-6	8141	425	19,1
ORG-7	7958	369	21,6
ORG-8	7824	352	22,2
ORG-9	7044	437	16,1
ORG-10	3387	232	14,6
ORG-11	7201	563	12,8
ORG-12	7690	421	18,3
ORG-13	1653	288	5,7
ORG-14	5390	390	13,8
ORG-15	7486	538	13,9
ORG-16	6413	569	11,3
ORG-17	6382	329	19,4

Los valores de M_w obtenidos para la lignina procedente de los diferentes ensayos del diseño organosolv de madera de pino se encuentran en el intervalo comprendido entre 1653 y 10767 g/mol, correspondientes a los experimento ORG-13 y ORG-4, respectivamente. En la Figura 7.18 se representan las curvas de distribución de pesos moleculares de las ligninas obtenidas en estos experimentos, que se corresponden con las condiciones experimentales en los niveles opuestos del diseño de temperatura, tiempo y concentración de etanol. El resto de distribuciones de pesos moleculares se recogen en el Anexo de la presente memoria.

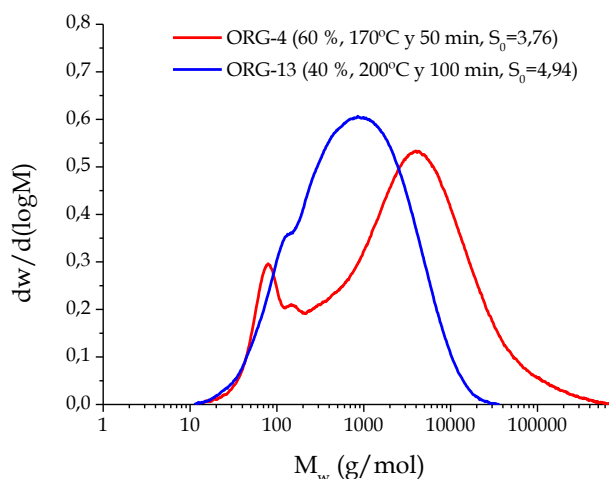


Figura 7.18. Distribución de pesos moleculares de la lignina organosolv de los experimentos ORG-4 y ORG-13.

Los pesos moleculares promedios decrecen a medida que se incrementan el tiempo y la temperatura de operación. Por ejemplo, en el nivel inferior de concentración de etanol (40 %), al aumentar el factor de severidad del proceso se produce la reducción de los pesos moleculares desde 7486 hasta 1653 g/mol, correspondiente a los factores de severidad de $S_0 = 3,76$ (ORG-15) y $S_0 = 4,94$ (ORG-13). Del mismo modo ocurre en el nivel superior de dicha variable (60 % de etanol), al pasar del factor de severidad más bajo ($S_0 = 3,76$, ORG-4), con un valor de M_w de 10767 g/mol, al factor más alto ($S_0 = 4,64$, ORG-14), cuyo valor es de 5390 g/mol.

La reducción de los pesos moleculares promedios de la lignina con el incremento de la intensidad del tratamiento, tanto en tiempo como en temperatura, se debe a la rotura de los enlaces éteres que la conforman. Cuando la lignina se despolimeriza y sus fragmentos se solubilizan en la lejía negra, las reacciones de despolimerización de la lignina continúan en la fase líquida. Con el incremento de la intensidad de tratamiento se produce, además, un incremento en la acidez del medio de reacción (apartado 7.2.1) por la liberación del ácido acético y por la formación de ácidos orgánicos procedentes de la degradación de la hemicelulosa. La mayor concentración de protones en el medio supone una mayor rotura de enlaces éteres de la lignina, especialmente los tipo α y β -aril (Erdocia y col., 2014). Por tanto, esta rotura de los enlaces implica la obtención de ligninas de menores pesos moleculares.

Los resultados obtenidos se encuentran en línea con los alcanzados por otros autores cuya materia prima también es madera y cuyas tendencias con respecto a las variables estudiadas son similares (Guo y col., 2015; Kim y col., 2015; Jang y col., 2016; Tao y col., 2016). A continuación se detallan dichos estudios sobre los pesos moleculares promedios de lignina organosolv.

Guo y col. (2015) observaron que el incremento del tiempo de tratamiento organosolv producía la reducción de los pesos moleculares promedios en las ligninas obtenidas a partir de una madera dura (*Populus tormentosa*), bajando así desde 9600 g/mol hasta 5090 g/mol a 150 min de tratamiento, empleando una temperatura de 205 °C. Tao y col. (2016) precipitaron las ligninas procedentes de una madera dura (*L. tulipifera*) tras someterla a diferentes tiempos de tratamiento, bajo una temperatura de 140 °C, y observaron el mismo comportamiento, obteniendo desde 8300 g/mol bajo 30 min de reacción hasta 5700 g/mol a los 120 min. Un incremento en la temperatura de operación al trabajar con una madera de álamo (*L. tulipifera*) se traduce en valores más bajos de pesos moleculares de ligninas provocados por la rotura de los enlaces éteres. Jang y col. (2016) obtuvieron ligninas con pesos moleculares promedios de 4276 g/mol al emplear 130 °C de tratamiento que se reducen hasta 2153 g/mol al trabajar a 170 °C. Kim y col. (2015) al incrementar la temperatura de 145 °C a 160 °C, durante un tiempo fijo de 10 min, rebajaban el peso molecular de la lignina organosolv de 4736 g/mol a 2130 g/mol. En la misma línea, se encuentra el comportamiento que ha sido observado en otros materiales lignocelulósicos como *Miscanthus x giganteus*, cuya lignina procedente de un proceso organosolv presentaba un intervalo de pesos moleculares entre 6500 y 3200 g/mol, al aplicar tratamientos con severidades comprendidas entre 1,75 y 2,93 (El Hage y col., 2010).

Con respecto a la influencia de la concentración de etanol sobre los pesos moleculares promedios, el aumento del alcohol en el disolvente de partida da lugar a un mayor peso molecular promedio de la lignina precipitada a partir de la lejía negra. De esta forma, bajo la misma severidad de tratamiento expresada en tiempo y temperatura (200 °C y 100 min, $S_0=4,94$), se obtiene un incremento desde 1653 g/mol, al 40 % de etanol, que aumenta hasta 5390 g/mol al 60 % de etanol, correspondiente a los ensayos ORG-13 y ORG-14 respectivamente. Este hecho implica que la menor

concentración del etanol en el disolvente de partida y, por tanto, un pH del medio de reacción más bajo, favorece las reacciones de despolimerización y la rotura de los enlaces β -O-4 de la lignina, dando lugar a menores pesos moleculares (Zhu y col., 2015).

Los valores de pesos moleculares promedios de la lignina precipitada tras el tratamiento organosolv muestran la influencia del medio de reacción generado durante la deslignificación sobre este parámetro. A medida que la reacción de deslignificación tiene lugar, se liberan fragmentos de lignina a la fase líquida. De forma paralela se produce la extracción de hemicelulosas de la madera que se solubilizan y se degradan en el medio de reacción, incrementando así su acidez. Esta caída de pH favorece la rotura de los enlaces de la lignina solubilizada, por lo que se reducen sus pesos moleculares promedios.

7.3.3. Estabilidad térmica

La lignina organosolv se analiza mediante análisis termogravimétrico para determinar su estabilidad térmica en función de las condiciones empleadas durante el proceso organosolv. Para ello se determinan la temperatura de degradación al 25 % y las cenizas a 800 °C. Se seleccionan cuatro muestras del diseño organosolv como representativas, ya que presentan las condiciones inferiores y superiores de los niveles del diseño de experimentos. Las curvas TGA y sus derivadas se muestran en la Figura 7.19. Se agrupan por la mayor y menor concentración de etanol (40 y 60 %), bajo las condiciones de severidad mayor (200 °C y 100 min, $S_0 = 4,94$) y menor (170 °C y 50 min, $S_0 = 3,76$).

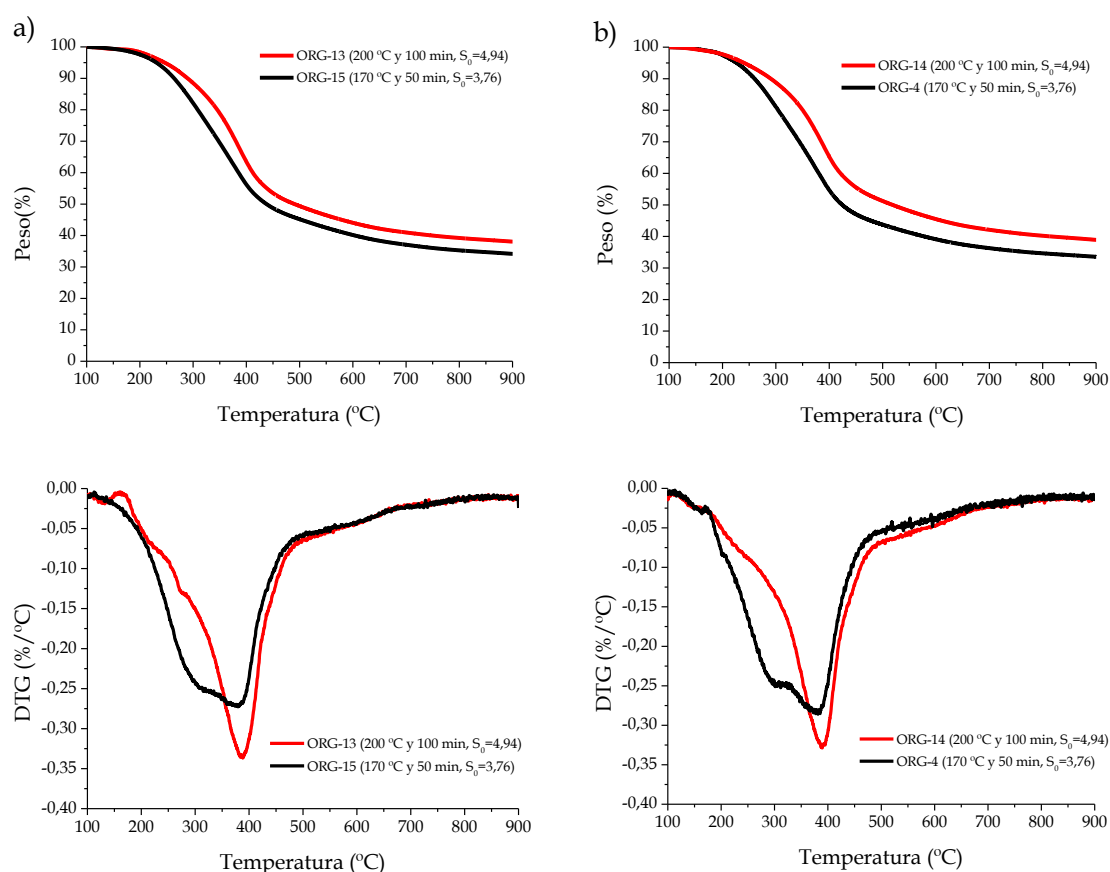


Figura 7.19. Curvas de TGA y DTG de las ligninas organosolv obtenidas a condiciones severas y suaves a diferentes porcentajes de etanol: a) 40 % y b) 60 %.

La influencia de la concentración de etanol sobre la estabilidad térmica de las ligninas organosolv es reducida, ya que las curvas resultantes a diferentes concentraciones de etanol de tratamiento son muy similares. Sin embargo, las condiciones de temperatura y tiempo sí que presentan mayor influencia sobre la estabilidad.

Como se observa en la Figura 7.19, las ligninas procedentes de condiciones más severas de tratamiento, ORG-13 y ORG-14 (200 °C y 100 min, $S_0 = 4,94$), presentan una mayor estabilidad térmica que las obtenidas bajo condiciones más suaves, ORG-15 y ORG-4 (170 °C y 50 min, $S_0 = 3,76$). El porcentaje de cenizas de las ligninas más estables alcanzan un 40 % (ORG-13 y ORG-14) frente a 35 % (ORG-15 y ORG-4) en las menos estables. Este mayor porcentaje de cenizas se puede relacionar con la presencia de una estructura más condensada, por la formación de enlaces C-C y C=C insaturados y un mayor contenido en carbono (Kim y col., 2013; Huijgen y col., 2014; Guo y col., 2015;

Tao y col., 2016). Por ejemplo, Hosseinaei y col. (2016), bajo condiciones más severas de tratamiento organosolv sobre una madera dura de álamo, alcanzaban un porcentaje de residuos de 37 % frente al 33 % obtenido en las condiciones más suaves, justificando este mayor porcentaje de cenizas por una mayor estabilidad térmica, asociado al mayor porcentaje de estructuras condensadas.

A la vista de las derivadas de TGA, de forma general, la degradación de la lignina se produce entre los 200 y 700 °C. Esta degradación en todas las curvas comienza en 200 °C, siendo la caída de la curva de DTG más pronunciada en las ligninas procedentes de las condiciones más suaves de operación (ORG-15 y ORG-4, 170 °C y 50 min, $S_0 = 3,76$) que dan lugar a un pico más ancho. En cambio, en las ligninas obtenidas a partir de las condiciones más severas (ORG-13 y ORG-14, 200 °C y 100 min, $S_0 = 4,94$), la principal caída se produce a partir de los 300 °C. En ambos casos, la pérdida principal de masa termina en 500 °C.

En la fase inicial de la degradación de la lignina, correspondiente al intervalo de temperaturas entre 200 y 350 °C, la pérdida de masa se debe a la rotura de los enlaces β -O-4 (Kim y col., 2013; Wen y col., 2013; Huijgen y col., 2014; Guo y col., 2015). Específicamente, la caída producida entre los 200 y 300 °C se asocia a la rotura del enlace β -O-4 mediante la descomposición térmica de los grupos alifáticos, especialmente del grupo situado en la posición C γ de la cadena alquílica. Esta liberación de los grupos hidroxilo da lugar a la producción de compuestos como agua y formaldehído (Hosseinaei y col., 2016). Por tanto, la mayor caída que se produce en las DTG de las ligninas obtenidas a condiciones suaves se debe a la mayor presencia de enlaces β -O-4, que da lugar a una temperatura de degradación menor (Hussin y col., 2013).

La degradación que tiene lugar a partir de los 300 °C se relaciona con la rotura de los enlaces intermoleculares entre los monómeros de la lignina que tiene como consecuencia la liberación de fenoles y también con la rotura de los enlaces metil-aril éter que dan lugar a la formación de metanol. La degradación del anillo aromático y la rotura de los enlaces carbono-carbono, como es el enlace 5-5, se produce en torno a los 400 °C (Wen y col., 2013; Hosseinaei y col., 2016). Destacar que el pico de máxima degradación en las ligninas obtenidas a las condiciones más severas se encuentra

próximo a esta temperatura, lo que se puede asociar a un mayor contenido de enlaces C-C en su estructura. A partir de esta temperatura (400 °C), se produce la mayor liberación de compuestos como agua, CO₂ y CO, ya que a menores temperaturas también se liberan, pero en menor proporción, debido a la rotura de las cadenas laterales de la lignina (Liu y col., 2008; Wen y col., 2013). El CO es el gas predominante y procede de la rotura de las uniones tipo éter entre unidades de lignina a bajas temperaturas y la disociación de los enlaces diaril éter a altas temperaturas (Liu y col., 2008). Finalmente, entre 400 y 600 °C, se produce al craqueo de los grupos metoxilo (OCH₃) de los anillos bencílicos, liberando metano (Wen y col., 2013; Guo y col., 2015; Hosseinaei y col., 2016). Además, el metano también puede ser generado a partir de la rotura de grupos metileno -CH₂- (Liu y col., 2008).

Las ligninas obtenidas bajo condiciones más severas de tratamiento son las de mayor estabilidad térmica, debido a que presentan a una menor proporción de enlaces β-O-4. Estos resultados están de acuerdo con la obtención de los pesos moleculares promedios más pequeños en las condiciones más severas (epígrafe 7.3.2). Un medio de reacción con mayor acidez debido a la generación de los ácidos procedentes de la despolimerización y degradación de la hemicelulosa de la madera, supone una mayor concentración de protones que son los responsables de la rotura de los enlaces de la lignina ya fragmentada y solubilizada en la lejía. Por tanto, las ligninas obtenidas bajo condiciones más severas presentan una menor proporción de enlaces β-O-4 y mayor de enlaces C-C, que dan lugar a una estabilidad térmica mayor.

Para completar el estudio de la estabilidad térmica de las ligninas organosolv y determinar la influencia de las variables independientes del diseño organosolv sobre la misma, se determina la temperatura de degradación al 25 % de cada una ellas y su porcentaje en cenizas a 800 °C (Tabla 7.28).

Tabla 7.28. Parámetros de degradación térmica de la lignina organosolv.

Experimento	T _{25 %} (°C)	Cenizas a 800 °C (%)
ORG-1	352	35,0
ORG-2	366	37,7
ORG-3	362	37,0
ORG-4	325	34,7
ORG-5	360	35,9
ORG-6	363	37,8
ORG-7	362	37,6
ORG-8	343	36,3
ORG-9	365	37,3
ORG-10	359	37,0
ORG-11	357	38,4
ORG-12	338	35,6
ORG-13	364	39,2
ORG-14	369	40,2
ORG-15	329	35,3
ORG-16	358	38,3
ORG-17	351	38,0

En la Tabla 7.29 se recoge el valor de los efectos principales, interacciones y efectos cuadráticos, junto con sus errores, de la temperatura de degradación al 25 % de la lignina organosolv.

Tabla 7.29. Efectos de los factores principales y sus interacciones sobre T_{25 %} de la lignina organosolv.

Efecto	Valor ± Error
C	3,721 ±0,827
T	19,531 ±0,827
t	13,213 ±0,827
C ²	-5,395 ±0,910
CT	1,750 ±1,080
Ct	2,750 ±1,080
T ²	-8,577 ±0,910
Tt	-12,250 ±1,080
t ²	-8,224 ±0,910
Media	363,210 ±0,880

El análisis de varianza de estos efectos se recoge en la Tabla 7.30. Los efectos no significativos se muestran en rojo y son aquellos que no cumplen con los criterios de $F > 18,51$ y $P < 0,05$, bajo un nivel de significación de 95 %.

Tabla 7.30. Valor y análisis de varianza de los efectos sobre T₂₅ % de la lignina organosolv.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	P
C	47,274	1	47,274	20,26	0,0460
T	1302,330	1	1302,330	558,14	0,0018
t	596,105	1	596,105	255,47	0,0039
C ²	82,043	1	82,043	35,16	0,0273
CT	6,125	1	6,125	2,62	0,2466
Ct	15,125	1	15,125	6,48	0,1258
T ²	207,350	1	207,350	88,86	0,0111
Tt	300,125	1	300,125	128,62	0,0077
t ²	190,610	1	190,610	81,69	0,0120
Falta de ajuste	(152,498)	(5)	(30,500)	(13,07)	(0,0726)
	173,748	7	24,8211	10,64	0,0886
Error puro	4,667	2	2,333		
Total	2739,530	16			

(): Valores para la falta de ajuste del análisis de varianza inicial

En este caso todos los efectos, exceptuando las interacciones CT y Ct, son significativos y forman parte del modelo que se representa en la ecuación [7.8]. El modelo obtenido presenta un valor de P en la falta de ajuste de 0,0886, mayor a 0,05, lo que confirma que representa adecuadamente los valores experimentales. Junto con la ecuación, se presentan el valor del coeficiente de correlación (R^2), el error estándar de la estimación y el error medio absoluto.

T ₂₅ % de lignina organosolv
$T_{25} \% \text{ de lignina organosolv } (^{\circ}\text{C}) = -769,778 + 2,88376C + 8,92847T + 4,27279t - 0,026977C^2 - 0,0190607T^2 - 0,0163333Tt - 0,00657906t^2$
$R^2 = 93,49 \%$
Error estándar de la estimación = 1,527
Error medio absoluto = 2,706

En la representación de los valores predichos por el modelo para la $T_{25\%}$ de las ligninas organosolv frente a los valores experimentales (Figura 7.20) se comprueba la buena concordancia que existe entre los pares de valores y, por tanto, la bondad del ajuste.

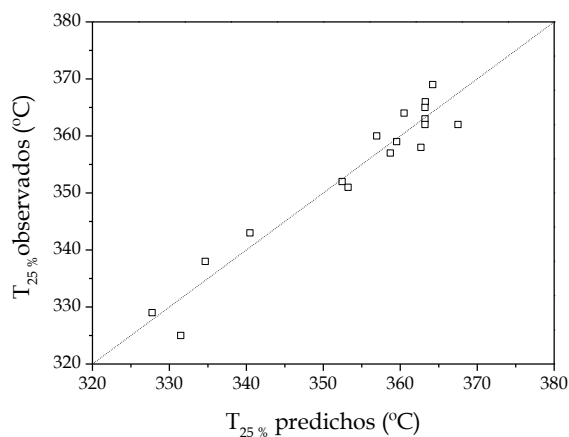


Figura 7.20. Valores experimentales frente a predichos por el modelo para $T_{25\%}$ de la lignina organosolv.

En la Figura 7.21 se muestra el mapa de contorno para temperatura de degradación al 25 % a la concentración de etanol fija al 50 %, 75 min de reacción y 185 °C de temperatura, respectivamente.

Los valores de la temperatura de degradación al 25 % para la lignina organosolv varían entre 325 y 369 °C. A la vista de los mapas de contorno y la tabla de los efectos (Tabla 7.29), se comprueba cómo las variables más influyentes son la temperatura y el tiempo. Estas variables presentan efectos cuyos valores son 19,5 y 13,2, respectivamente; efectos mayores que el presentado por la concentración de etanol, con un valor de 3,7, es decir, que el cambio del nivel más bajo (40 %) al más alto (60 %) sólo supone una variación de 3,7 °C en la temperatura de degradación al 25 % de la lignina.

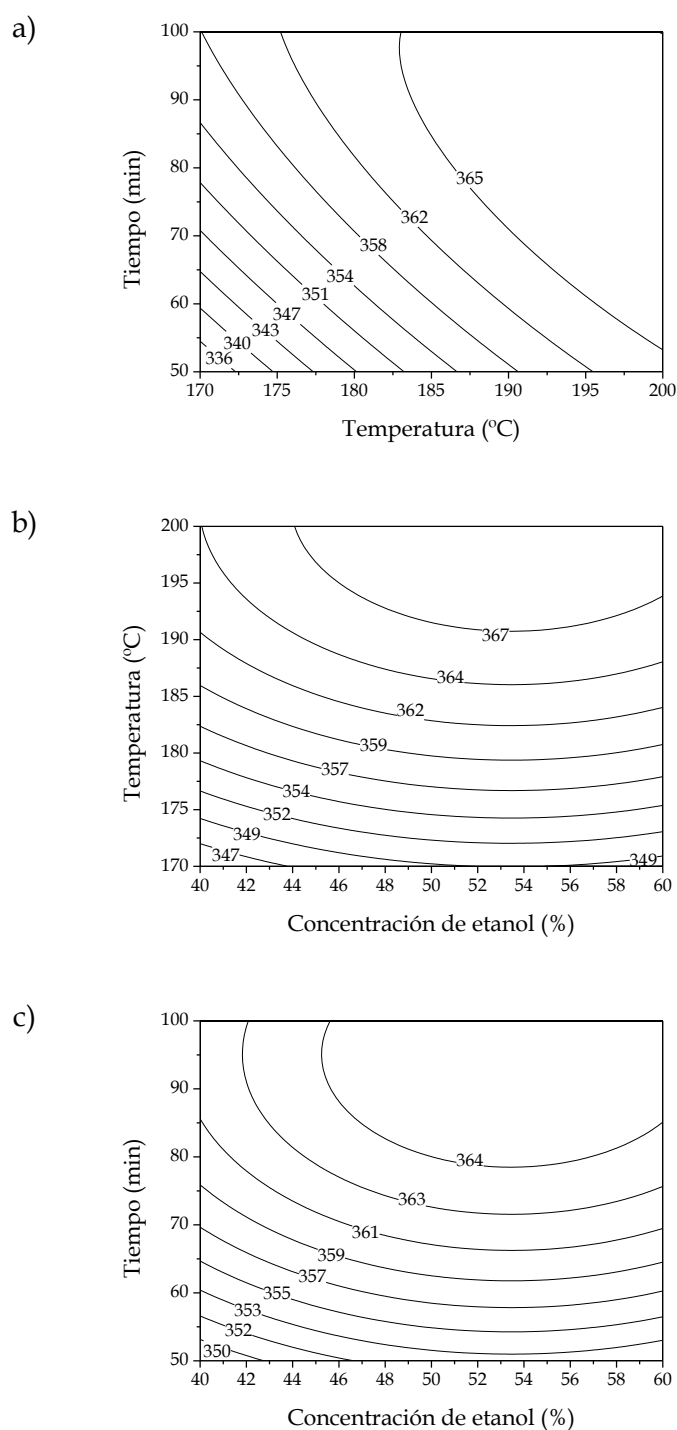


Figura 7.21. Mapa de contorno de $T_{25\%}$ de la lignina organosolv (°C):
a) $C_{EtOH} = 50\%$, b) $t = 75\text{ min}$ y c) $T = 185\text{ °C}$.

Por tanto, se puede afirmar que el incremento de intensidad de tratamiento, expresado tanto en temperatura como en tiempo, supone un aumento en la temperatura de degradación, así como en la estabilidad térmica de la lignina organosolv obtenida. Este comportamiento es el mismo que el obtenido para las

ligninas procedentes de una madera dura (*Liquidambar styraciflua*) en un proceso organosolv empleando glicerol como disolvente. La estabilidad de dichas ligninas, expresadas en ese caso como T₅%, se incrementaba desde 248 °C hasta 297 °C al incrementar el factor de severidad del tratamiento de 4,14 a 5,20 (Zhang y col., 2016c).

Con respecto a los porcentajes de cenizas, todos se encuentran en el intervalo entre 35 y 40 %. Estos datos, obtenidos bajo atmósfera inerte de nitrógeno, son similares a los alcanzados por ligninas procedentes de procesos organosolv aplicados a otras materias primas como podas de olivo, hierbas o madera de álamo (Toledano y col., 2011; Kim y col., 2013; Hosseinaei y col., 2016). Estas cenizas presentan ventajas tanto económicas como medioambientales si se plantea el empleo de la lignina obtenida como precursor de carbono para fibras de carbono o carbón activo (Hosseinaei y col., 2016; Tao y col., 2016). Un mayor porcentaje de cenizas implica que la estructura de la lignina está más condensada y presenta un mayor contenido de enlaces C-C, por tanto, favorecería la estabilización durante la formación de la fibra y reduciría el tiempo de conversión de fibras de lignina a fibras de carbono. Las ligninas con mayor contenido en anillos guayacilo, como es el caso de la procedente de la madera de pino, presentan mayor tendencia a las reacciones de condensación debido a los carbonos que tiene sin sustituir en el anillo aromático. Por tanto, daría lugar a un rendimiento de carbono mayor en la conversión a fibras de carbono, reduciendo costes en la fabricación de estas fibras (Hosseinaei y col., 2016).

Los resultados obtenidos sobre la estabilidad térmica de las ligninas precipitadas organosolv están en concordancia con las otras respuestas analizadas en este trabajo. Con el incremento de la intensidad de tratamiento se favorece la deslignificación de la madera mediante la despolimerización y solubilización de la lignina. La rotura de los enlaces de los fragmentos solubilizados de lignina en la lejía negra da lugar a ligninas más estables, ya que presentan menor proporción de enlaces más débiles (β -O-4) en su estructura y con pesos moleculares promedios más pequeños.

7.4. Selección de las condiciones favorables del proceso organosolv

La selección de las condiciones favorables del proceso organosolv autocatalítico para la madera de *Pinus radiata* se va a realizar teniendo en cuenta distintas respuestas: el porcentaje de celulosa en el sólido deslignificado, el grado de deslignificación y la recuperación de lignina de la lejía negra. Estas respuestas se han elegido desde el punto de vista del fraccionamiento de la madera, así como de la recuperación de sus componentes.

Los porcentajes más altos de celulosa en el sólido deslignificado corresponden a los experimentos llevados a cabo a mayor temperatura y menor porcentaje de etanol: ORG-10 y ORG-3 (temperatura en el nivel superior 200 °C, etanol en el nivel inferior 40 %); en estos experimentos se alcanza un contenido de celulosa en el sólido en torno al 72 %. Por tanto, una alta temperatura combinada con un porcentaje del 40 % de etanol favorece la obtención de un sólido rico en celulosa.

La deslignificación en este proceso autocatalítico, estudiada por el grado de deslignificación en los sólidos, está muy influida por los efectos contrapuestos que da lugar la concentración de etanol, a saber, la rotura de los enlaces y la solubilización de la lignina, obteniendo sus mejores resultados en el porcentaje de etanol del 45 %. En cuanto a la temperatura y el tiempo, el grado de deslignificación se ve favorecido por el incremento de estas condiciones, por ello los resultados más altos también se encontraban en los experimentos de condiciones más severas (ORG-13 y ORG-3).

En cuanto a la última respuesta considerada, la recuperación de la lignina extraída durante el proceso organosolv, también se ve favorecida por el incremento en las condiciones de tiempo y temperatura. Sin embargo, en cuanto al porcentaje de etanol empleado, los mejores resultados se encontraban en el intervalo 52-56 %.

A la vista de los resultados expuestos, las condiciones más favorables para estas tres respuestas son las condiciones más altas de temperatura y tiempo dentro del intervalo estudiado: 200 °C y 100 min ($S_0 = 4,94$). Con respecto al porcentaje de etanol, se busca una situación de compromiso entre las respuestas en las que más influye esta

variable: la deslignificación y la recuperación de lignina, y por ello, se selecciona un 50 %.

Condiciones más favorables de organosolv
Concentración de etanol: 50 %
Temperatura: 200 °C
Tiempo: 100 min

Una vez seleccionadas las condiciones favorables del proceso organosolv autocatalítico para la madera de *Pinus radiata* se realiza un experimento adicional bajo estas condiciones de operación. De esta forma se lleva a cabo la validación de los modelos obtenidos mediante la comparación de los resultados alcanzados experimentalmente y los predichos por los modelos. En la Tabla 7.31 se recogen los resultados de esta validación.

Tabla 7.31. Validación de los modelos en las condiciones favorables del proceso organosolv.

Respuesta	Experimental	Modelo	Error _R (%)
Sólidos tratados (%)	56,2	52,0	7,6
Celulosa en sólido (%)	69,6	65,9	5,3
Grado de deslignificación (%)	70,0	74,0	5,8
Recuperación de lignina (%)	32,2	36,6	11,9

Se comprueba que los errores entre los valores experimentales y los proporcionados por los modelos son todos menores a 12 %, lo que demuestra la bondad de los ajustes de los modelos establecidos para predecir estas respuestas.

Estas condiciones experimentales del proceso organosolv autocatalítico se emplean como punto de partida para estudiar los tratamientos secuenciales compuestos por una primera etapa de autohidrólisis y una segunda etapa organosolv que se describen a continuación en el capítulo 8 de la presente memoria.

8. TRATAMIENTO SECUENCIAL AUTOHIDRÓLISIS-ORGANOSOLV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8. TRATAMIENTO SECUENCIAL AUTOHIDRÓLISIS-ORGANOSOLV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se exponen los resultados y la discusión del tratamiento de la madera de pino, *Pinus radiata*, mediante una secuencia autohidrólisis-organosolv (AH-ORG). Se estudia la incorporación de la autohidrólisis previa a un proceso organosolv para extraer las hemicelulosas de la madera y conocer cómo afecta esta etapa a la posterior deslignificación e hidrólisis enzimática.

Para estudiar el efecto de la incorporación de la autohidrólisis, se comparan los sólidos obtenidos tras la secuencia de tratamientos con el sólido procedente del proceso organosolv sin etapa previa (Figura 5.1). Se cuantifican los sólidos tratados, se determina su composición, se analiza su estabilidad térmica y los cambios en sus grupos funcionales. Estos sólidos se emplean como sustrato en la hidrólisis enzimática para conocer la conversión de la celulosa, presente en ellos, a glucosa.

Junto con el estudio de la incorporación de la autohidrólisis, se aborda la adición de un catalizador ácido a la deslignificación organosolv, planteando así las condiciones autocatalíticas y ácidas del proceso. Dichas condiciones se emplean tanto en los procesos organosolv aislados como en los procesos secuenciales con autohidrólisis previa.

Para completar este estudio, además del análisis de la fase sólida obtenida, también se caracterizan la lejía negra y la lignina organosolv. Se cuantifican los compuestos presentes en la lejía negra y se determinan los pesos moleculares y la estabilidad térmica de la lignina organosolv.

8.1. Caracterización de la fase sólida

En primer lugar se cuantifica el sólido tratado y, posteriormente, se determina su contenido en carbohidratos y lignina mediante la caracterización NREL, su estabilidad térmica mediante TGA y los cambios estructurales por FTIR.

8.1.1. Análisis gravimétrico

La cantidad de sólido obtenido en la deslignificación en los procesos organosolv (ORG) y en los procesos secuenciales (AH-ORG), se muestra en la Figura 8.1. En la Figura 8.1a se representa el porcentaje de sólidos tratados resultantes de la etapa organosolv ácida y autocatalítica en función del tipo de material introducido a dicha etapa, madera sin autohidrolizar o autohidrolizada obtenida bajo diferentes factores de severidad ($S_0 = 2,95$, $S_0 = 3,84$ y $S_0 = 4,60$). Este porcentaje se determina empleando la ecuación [5.10]. En la Figura 8.1b se representa la cantidad de sólidos totales, referida a 100 g de pino, tras el tratamiento organosolv (ácido y autocatalítico) como proceso aislado y tras la secuencia completa de tratamientos (autohidrólisis y organosolv).

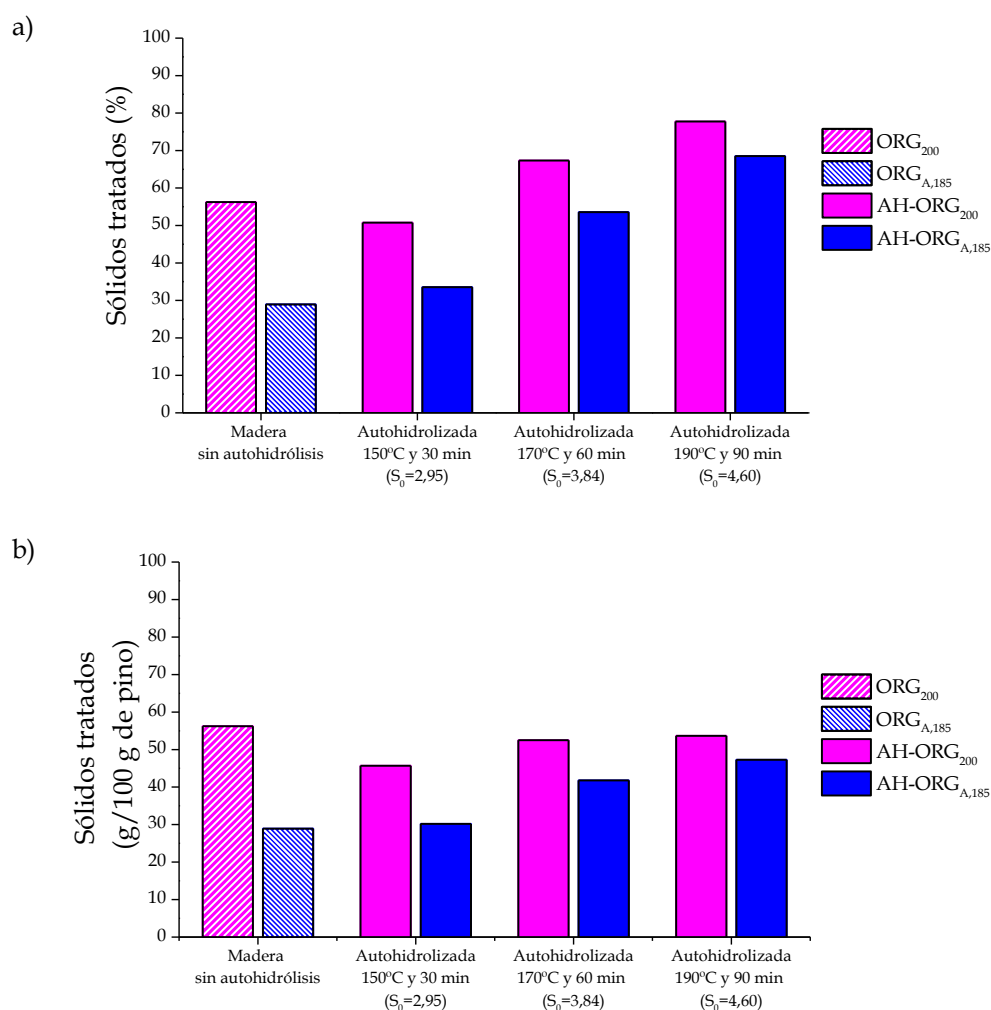


Figura 8.1: a) Sólidos tratados de la etapa organosolv referidos a la madera introducida a la etapa (%) y b) Sólidos tras el proceso secuencial referidos a 100 g de madera de pino.

La cantidad de sólidos tratados obtenidos en el proceso organosolv ácido (ORG_{A,185}) es menor que en el autocatalítico (ORG₂₀₀), 28,9 % y 56,2 %, respectivamente (Figura 8.1a). Al emplear un proceso organosolv ácido existe una mayor solubilización de las fracciones. El ácido sulfúrico acelera el proceso de hidrólisis de los enlaces lignina-lignina y lignina-carbohidratos, favoreciendo la eliminación de estas fracciones de la madera de partida y su solubilización en la fase líquida (Li y col., 2012). El ácido mineral empleado como catalizador aporta una cantidad inicial de protones más elevada que incrementa la rotura de estos enlaces, mejorando tanto la velocidad como la extensión de la deslignificación (Zhang y col., 2016b).

En la secuencia autohidrólisis-organosolv ácido (AH-ORG_{A,185}), la cantidad de sólidos que permanece tras esta combinación es mayor al incrementar el factor de

severidad desde 2,95 a 4,60 en la etapa de la autohidrólisis. Este incremento supone una menor solubilización de las fracciones de la madera autohidrolizada durante la deslignificación organosolv. En la secuencia con las condiciones más suaves de autohidrólisis (AH₁₅₀-ORG_{A,185}, S₀ = 2,95) se obtiene un 33,5 % de sólidos tratados, mientras que con las más severas (AH₁₉₀-ORG_{A,185}, S₀ = 4,60) es de 68,5 %. La misma tendencia se obtiene con la secuencia autohidrólisis-organosolv autocatalítico (AH-ORG₂₀₀), variando la cantidad de sólidos tratados entre 50,7 y 77,7 %. Estos resultados muestran que el aumento de la severidad de la autohidrólisis dificulta la posterior deslignificación.

La menor solubilización de las fracciones durante el proceso organosolv se puede asociar a la formación de una lignina más difícil de fragmentar durante la etapa de autohidrólisis. Esta lignina es más difícil de eliminar porque contiene una menor proporción de enlaces débiles, como el β -O-4 y una mayor de enlaces más estables carbono-carbono que han sido generados en dicha etapa (Li y col., 2007; Cao y col., 2012; Wang y col., 2016). El cambio en la proporción de enlaces que unen los monómeros de la lignina se debe a las reacciones de despolimerización y recondensación de la misma. Cuando el medio de reacción es ácido, como es el producido en las condiciones más severas de autohidrólisis por la formación de ácidos orgánicos, como el ácido acético y el ácido fórmico, se genera el carbocatión bencílico en la posición α de la cadena alifática. A partir de él, tiene lugar las reacciones que llevan a la rotura del enlace β -O-4. Sin embargo, este carbocatión electrofílico también reacciona con otros fragmentos de la lignina dando lugar a la recondensación de la misma (El Hage y col., 2010; Pielhop y col., 2015). Estudios previos indican que la formación de los nuevos enlaces carbono-carbono se producen preferiblemente en las unidades guayacilo y que tiene lugar en las posiciones C₂ y C₆ del anillo aromático (Li y Gellerstedt, 2008; Cao y col., 2012; Pielhop y col., 2015). Otros autores apoyan esta idea por el menor impedimento estérico que presentan este tipo de anillos para que estén más involucrados en las reacciones de recondensación, ya que tienen más carbonos sin sustituir (Wang y col., 2016).

La lignina de la madera de pino empleada como materia prima presenta un alto porcentaje de anillos guayacilo en su estructura, que daría lugar a las reacciones de recondensación durante la autohidrólisis, creando enlaces más estables y dificultando la deslignificación en la etapa organosolv (Pielhop y col., 2015). Otras materias primas como hierbas (*Miscanthus*) o residuos de palma de aceite, también presentan un alto contenido en anillos guayacilo, lo que explica la mayor dificultad para su deslignificación organosolv por la repolimerización producida en la autohidrólisis (Timilsena y col., 2013).

A fin de evitar dicha repolimerización, algunos autores han estudiado la adición de un compuesto altamente nucleofílico en la autohidrólisis, el naftol. De esta forma, este compuesto reacciona con el carbocatión bencílico y evita que reaccione con otros fragmentos de la lignina y, provocando la recondensación de la misma (El Hage y col., 2010; Timilsena y col., 2013; Pielhop y col., 2015). La adición del naftol, sin afectar a la recuperación de los azúcares de las hemicelulosas, mejora las etapas posteriores del proceso, bien la deslignificación en la etapa organosolv y la posterior sacarificación de la celulosa presente en el sólido tratado o bien la hidrólisis enzimática tras el tratamiento de autohidrólisis.

En la secuencia formada por la autohidrólisis a condiciones más suaves y el organosolv autocatalítico (AH₁₅₀-ORG₂₀₀), la cantidad de sólidos obtenidos es menor que la resultante del proceso organosolv autocatalítico sin autohidrólisis previa (ORG₂₀₀), un 50,7 % frente a un 56,2 % (Figura 8.1a). En este caso, la autohidrólisis suave ($S_0 = 2,95$) no dificulta el proceso de deslignificación organosolv. La apertura de la madera durante el proceso de autohidrólisis y la eliminación de parte de las hemicelulosas genera la rotura de los enlaces lignina-carbohidratos y mejora la reactividad y la deslignificación en la etapa organosolv (Moniz y col., 2015).

En la Figura 8.1b se representa la cantidad global de sólidos tras las secuencias referidos a 100 g de madera de pino. En la secuencia autohidrólisis-organosolv autocatalítico, esta cantidad varía entre 45,7 y 53,6 g/100 g de madera de pino, correspondiendo a los ensayos AH₁₅₀-ORG₂₀₀ y AH₁₉₀-ORG₂₀₀. Además, se encuentra muy próxima a los 56,2 g obtenidos en el proceso organosolv autocatalítico (ORG₂₀₀). Estos resultados están en línea con los obtenidos por Huijgen y col. (2012), cuyos

porcentajes de sólidos globales, referidos a la materia prima de partida, tras la secuencia autohidrólisis-organosolv autocatalítico se encontraban entre 46,2 % y 56,6 % para paja de trigo y los de Romaní y col. (2011), cuyo intervalo variaba entre 47,9 % y 66,6 % para madera de *Eucalyptus globulus*.

La cantidad menor de sólidos obtenida en las secuencias con el proceso organosolv ácido (ORG_{A,185}), 30,2 g en el ensayo AH₁₅₀-ORG_{A,185} a 47,3 g en el ensayo AH₁₉₀-ORG_{A,185}, bajando incluso a 28,9 g/100 g de madera en el proceso sin autohidrólisis, se explica porque la adición de catalizador favorece la solubilización de las fracciones de la madera. El incremento de la acidez del medio de reacción proporcionado por el ácido sulfúrico favorece la rotura de los enlaces de la lignina.

A la vista de los resultados de la cantidad de sólidos resultantes tras la secuencia de tratamientos, se comprueba que el incremento del factor de severidad de la autohidrólisis supone una reducción de la solubilización de las fracciones de la madera autohidrolizada durante el proceso organosolv, asociada a la recondensación de la lignina que se produce durante la autohidrólisis. Esta etapa realizada en condiciones severas genera una lignina más estable y menos atacable durante la deslignificación, por lo que su despolimerización y eliminación de la fase sólida se reduce. Además, se confirma el efecto positivo del catalizador sobre la deslignificación a pesar de que en todos los casos la autohidrólisis previa realizada, incluso en las condiciones más suaves, dificulta el proceso de deslignificación. A continuación, se exponen los resultados de la composición del sólido tratado que permiten identificar las fracciones que se solubilizan durante la etapa organosolv.

8.1.2. Composición

La composición de la fase sólida obtenida, tanto en los procesos organosolv como en las secuencias de tratamientos, se muestra en la Figura 8.2. En ella se representan los porcentajes de la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, agrupados según las condiciones de deslignificación organosolv empleadas (autocatalíticas o ácidas).

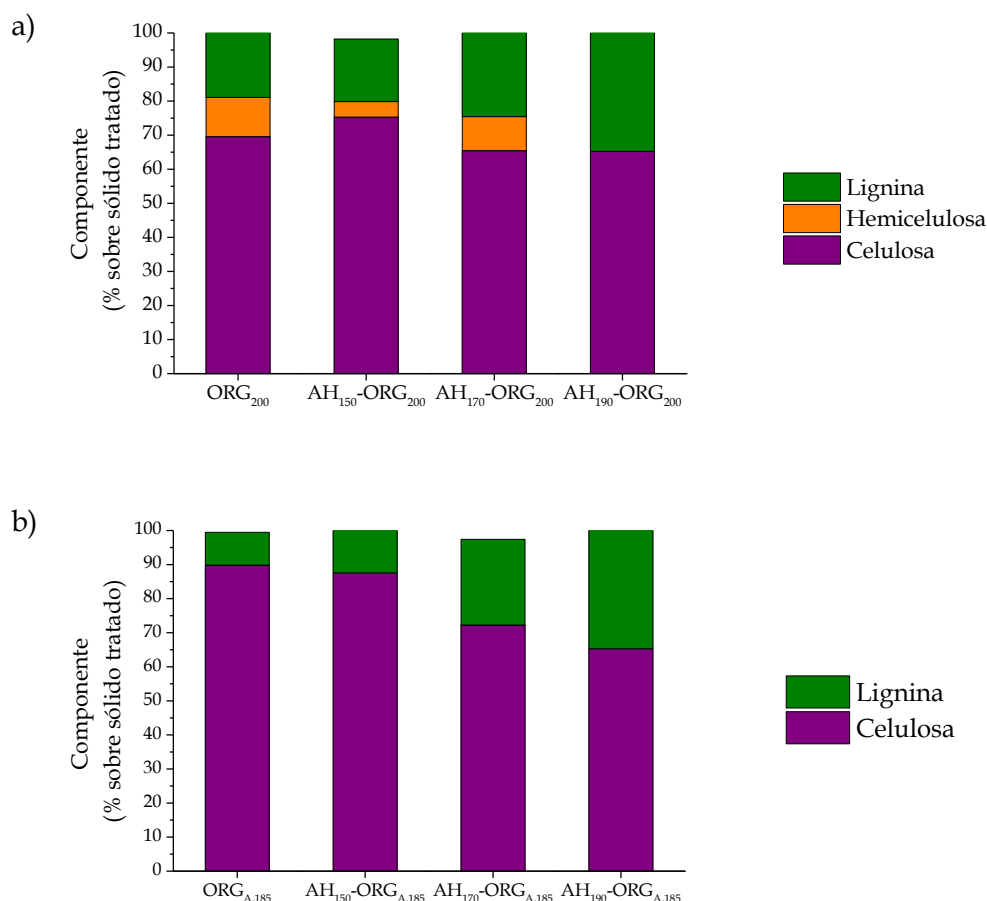


Figura 8.2. Composición de los sólidos tratados tras los procesos organosolv y procesos secuenciales: a) Organosolv autocatalítico y b) Organosolv ácido.

El contenido en celulosa de los sólidos obtenidos en el proceso organosolv en autocatalítico se muestra en la Figura 8.2a. En todos los ensayos, bien sea en el proceso organosolv (ORG₂₀₀) o en los procesos secuenciales (AH-ORG₂₀₀), el porcentaje de celulosa en el sólido se encuentra entre un 65 y un 75 %. El valor más alto (75 %) corresponde a la secuencia con la autohidrólisis a condiciones más suaves (150 °C y 30 min), es decir, al ensayo AH₁₅₀-ORG₂₀₀. Estos valores suponen que la cantidad de celulosa que se mantiene en el sólido tras la deslignificación organosolv se encuentra

entre un 80 y 90 % de la madera inicial. Estos datos son próximos a los obtenidos con esta misma secuencia de tratamientos empleando otros materiales lignocelulósicos como el 85 % para la paja de arroz o el 93-95 % para la paja de trigo (Huijgen y col. 2012; Moniz y col., 2015).

En comparación con las condiciones autocatalíticas, los sólidos obtenidos en el organosolv ácido presentan mayor porcentaje en celulosa (Figura 8.2b). Los porcentajes más altos, próximos al 90 %, corresponden al proceso organosolv ácido ($ORG_{A,185}$) y a la secuencia con las condiciones más suaves de autohidrólisis ($AH_{150}-ORG_{A,185}$). Sin embargo, se pierde entre un 20 y un 40 % de la celulosa introducida al tratamiento por la actuación del catalizador durante el proceso organosolv ácido, correspondiendo a los ensayos $AH_{190}-ORG_{A,185}$ y $ORG_{A,185}$, respectivamente. El catalizador acelera la rotura de los enlaces lignina-carbohidratos y lignina-lignina, generando la hidrólisis de la celulosa y la deslignificación del sólido (Li y col., 2012).

El contenido en lignina de los sólidos tratados se incrementa con el factor de severidad de la autohidrólisis. En el organosolv autocatalítico, el contenido en lignina asciende desde un 18 % ($AH_{150}-ORG_{200}$) a un 34 % ($AH_{190}-ORG_{200}$); mientras que en el organosolv ácido se incrementa desde un 14 % ($AH_{150}-ORG_{A,185}$) hasta un 35 % ($AH_{190}-ORG_{A,185}$). Destacar que el contenido en lignina en los sólidos procedentes de las secuencias con la autohidrólisis a condiciones severas, 190 °C y 90 min, es similar (35 %). Estos resultados confirman que durante la primera etapa de autohidrólisis se producen reacciones de recondensación de la lignina, como se ha detallado en el epígrafe anterior (8.1.1)

Para completar el estudio de la eliminación de lignina, se calcula el grado de deslignificación (GD (%)) de los procesos secuenciales y se representa frente al factor de severidad (S_0) de la autohidrólisis (Figura 8.3). Asimismo se incluye el valor para los procesos organosolv aislados (ORG_{200} y $ORG_{A,185}$). Para determinarlo, se ha empleado la ecuación [5.10], partiendo de los datos de la lignina Klason en el pino inicial y la presente en el sólido final, ya que la deslignificación producida en la autohidrólisis se considera despreciable.

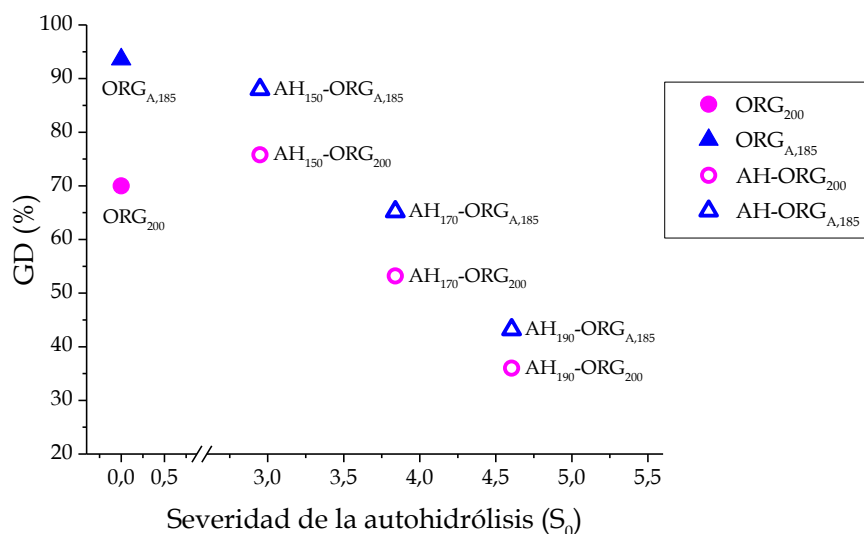


Figura 8.3. Grado de deslignificación (%) frente al factor de severidad de la autohidrólisis (S_0).

La adición del catalizador ácido favorece la eliminación de lignina de la madera de pino, alcanzándose en ORG_{A,185} un grado de deslignificación de 93,6 % frente al 70 % obtenido en condiciones autocatalíticas (ORG₂₀₀). Durante el tratamiento organosolv ácido, el catalizador causa una mayor despolimerización de la estructura macromolecular de la lignina en el sólido mediante la rotura de los enlaces α -O-4 y β -O-4, lo que da lugar a fragmentos de lignina más pequeños que se solubilizan en el etanol (Jang y col., 2016).

Como se muestra en la Figura 8.3, los valores del grado de deslignificación de las secuencias de tratamientos, excepto en el ensayo AH₁₅₀-ORG₂₀₀, son menores que los obtenidos en los procesos organosolv (ORG₂₀₀ y ORG_{A,185}). Además, existe una relación inversamente proporcional entre la intensidad de la autohidrólisis expresado como factor de severidad y el grado de deslignificación. Al incrementar el factor de severidad de la autohidrólisis desde 2,95 a 4,60, el grado de deslignificación se reduce desde 75,8 % hasta 36,0 % en condiciones autocatalíticas y desde un 88,0 % hasta un 43,2 % en las condiciones ácidas. La secuencia formada por la autohidrólisis a condiciones suaves y el organosolv autocatalítico (AH₁₅₀-ORG₂₀₀) alcanza un grado de deslignificación del 76 %, mayor que el obtenido en el proceso autocatalítico (ORG₂₀₀), un 70 %. En este caso, la incorporación de la autohidrólisis a condiciones suaves y la

eliminación de parte de las hemicelulosas favorece la deslignificación del sólido en la etapa organosolv (Moniz y col., 2015).

Otros autores observaron la disminución de deslignificación al incorporar la etapa de autohidrólisis previa al proceso organosolv. Huijgen y col. (2012) en su trabajo con paja de trigo, aplicando una autohidrólisis a 190 °C, la deslignificación se reducía hasta el 43 % en un proceso organosolv llevado a cabo a 200 °C, 60 min y un 60 % de etanol. Zhu y col. (2015) observaron un mayor porcentaje de lignina en el sólido procedente de la madera de *Eucommia ulmoides* al introducir la etapa de autohidrólisis a 180 °C previa al organosolv ácido (180 °C, 30 min, 50 % de etanol y catalizado por HCl), alcanzando un 21,3 % frente al 11,6 % obtenido en el proceso organosolv.

Los resultados de la deslignificación están en concordancia con la cantidad de sólidos obtenidos en la etapa organosolv, confirmando que la eliminación de lignina en los procesos secuenciales autohidrólisis-organosolv es el factor principal en la disminución de la cantidad de los sólidos tratados (Figura 8.4).

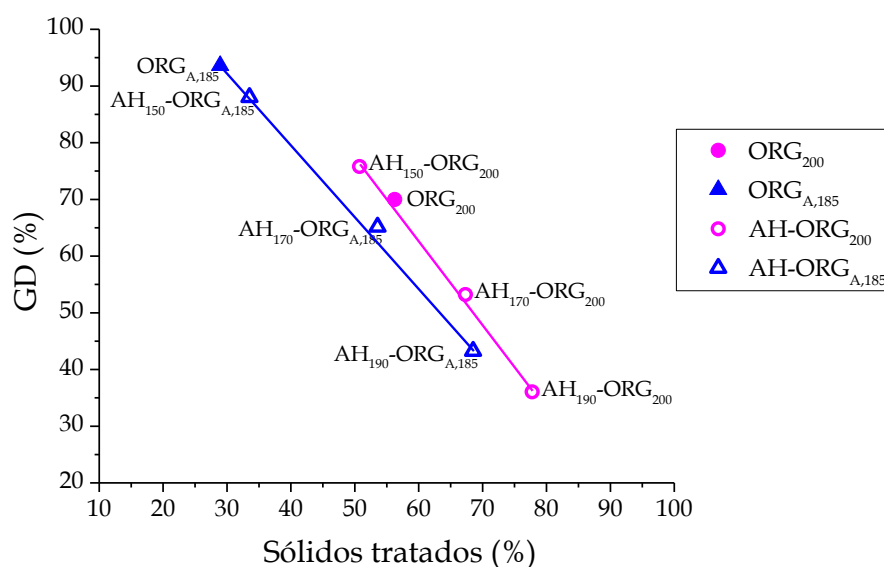


Figura 8.4. Grado de deslignificación (%) frente a sólidos tratados en la etapa organosolv (%).

La Figura 8.5 muestra las tonalidades de los sólidos procedentes de los procesos organosolv y de las secuencias autohidrólisis-organosolv, divididos según las condiciones de la deslignificación organosolv, autocatalíticas o ácidas.



Figura 8.5. Tonalidades de los sólidos de los procesos organosolv y los procesos secuenciales.

Se comprueba que los sólidos con un mayor contenido de lignina (35 %) en su composición son aquellos que presentan tonalidades más oscuras, especialmente los procedentes de los procesos secuenciales con autohidrólisis realizadas a las condiciones más severas (AH₁₉₀-ORG₂₀₀ y AH₁₉₀-ORG_{A,185}). Por el contrario, los sólidos con un alto porcentaje en celulosa (88-90 %) son más claros, correspondiendo a los ensayos cuya deslignificación se lleva a cabo en condiciones ácidas, proceso organosolv ácido (ORG_{A,185}) y la secuencia formada por una autohidrólisis a condiciones suaves y un organosolv ácido (AH₁₅₀-ORG_{A,185}).

El estudio de la composición de los sólidos obtenidos tras la secuencia de tratamientos confirma que el incremento del factor de severidad de la autohidrólisis supone la obtención de sólidos con menores grados de deslignificación durante el organosolv y, por tanto, menores porcentajes de celulosa en dichos sólidos. Además, se confirma que la adición de un catalizador ácido mejora la eliminación de la lignina, favoreciendo la obtención de un sólido más rico en celulosa. De este modo, bajo condiciones de operación suaves en la autohidrólisis y el proceso organosolv catalizado se obtienen altos porcentajes de celulosa en el sólido, con valores próximos al 90 % (ORG_{A,185} y AH₁₅₀-ORG_{A,185}).

8.1.3. Estabilidad térmica

Los resultados de la estabilidad térmica de los sólidos procedentes de los procesos organosolv (ORG) y los procesos secuenciales (AH-ORG) se recogen en la Tabla 8.1. Los parámetros de degradación térmica elegidos para el análisis térmico de estos sólidos son la temperatura de degradación al 10 % ($T_{10\%}$), la temperatura de degradación máxima (T_{\max}) y el porcentaje de cenizas a 800 °C.

Tabla 8.1. Parámetros de degradación térmica de los sólidos procedentes de los procesos organosolv y procesos secuenciales.

Experimento	$T_{10\%}$ (°C)	T_{\max} (°C)	Cenizas a 800 °C (%)
ORG ₂₀₀	292	342	21,9
AH ₁₅₀ -ORG ₂₀₀	296	347	20,1
AH ₁₇₀ -ORG ₂₀₀	282	333	26,5
AH ₁₉₀ -ORG ₂₀₀	272	321	30,3
ORG _{A,185}	320	347	14,7
AH ₁₅₀ -ORG _{A,185}	316	346	17,6
AH ₁₇₀ -ORG _{A,185}	296	346	22,9
AH ₁₉₀ -ORG _{A,185}	275	329	29,0

La estabilidad térmica de los sólidos se reduce con el incremento de la severidad de la autohidrólisis. En las secuencias formadas por una autohidrólisis y el organosolv autocatalítico (AH-ORG₂₀₀), la temperatura de degradación al 10 % se reduce desde 296 °C hasta a 272 °C, al incrementar el factor de severidad de la autohidrólisis desde 2,95 a 4,60; mientras que el porcentaje de cenizas a 800 °C se incrementa desde un 20,1 % a un 30,3 %. De forma paralela, en las secuencias formadas por una autohidrólisis y el organosolv ácido (AH-ORG_{A,185}), la $T_{10\%}$ disminuye desde 316 °C a 275 °C; mientras que las cenizas a 800 °C se incrementan desde 17,6 a 29,0 % con el aumento del factor de severidad de la autohidrólisis desde 2,95 a 4,60. Estos valores se pueden relacionar con el contenido de fases amorfas en los materiales, en este caso, con la lignina Klason. Las muestras que presentan un menor grado de deslignificación menos estables térmicamente y dan lugar a un mayor porcentaje de cenizas y un menor valor de $T_{10\%}$ (Sun y col., 2015).

La temperatura de degradación máxima, obtenida a partir de las derivadas de las curvas de TGA, también muestra la misma tendencia que la $T_{10\%}$. En las secuencias

formadas por autohidrólisis y organosolv autocatalítico, la T_{\max} se reduce desde 347 °C en la secuencia con las condiciones más suaves de autohidrólisis (AH₁₅₀-ORG₂₀₀) hasta 321 °C en la secuencia con las condiciones más severas de autohidrólisis (AH₁₉₀-ORG₂₀₀). En el caso de las condiciones ácidas, se observa la misma reducción de temperatura desde 346 °C (AH₁₅₀-ORG_{A,185}) hasta 328 °C (AH₁₉₀-ORG_{A,185}). Este cambio de la temperatura de degradación máxima se puede relacionar con el contenido en celulosa de los sólidos, ya que la temperatura máxima de degradación de la celulosa pura se encuentra próxima a 360 °C (Chen y col., 2010). Los sólidos que son más ricos en celulosa presentan valores mayores de T_{\max} y más cercanos a este dato que aquellos con un mayor contenido en lignina, cuyos valores T_{\max} son menores.

La adición del catalizador ácido en el tratamiento organosolv da como resultado sólidos más estables térmicamente, ya que se componen principalmente por celulosa, resultando que la $T_{10\%}$ y la T_{\max} de los sólidos obtenidos en condiciones ácidas son mayores que las obtenidas en condiciones autocatalíticas. Del mismo modo, el porcentaje de cenizas a 800 °C es menor en las condiciones ácidas que en las autocatalíticas, asociado al menor contenido de lignina en los sólidos, tal y como se detalla en el epígrafe 8.1.2.

En la Figura 8.6 se muestran las curvas de TGA y sus derivadas de los sólidos deslignificados de los procesos organosolv y procesos secuenciales, agrupados en función de las condiciones del organosolv, autocatalítico o ácido.

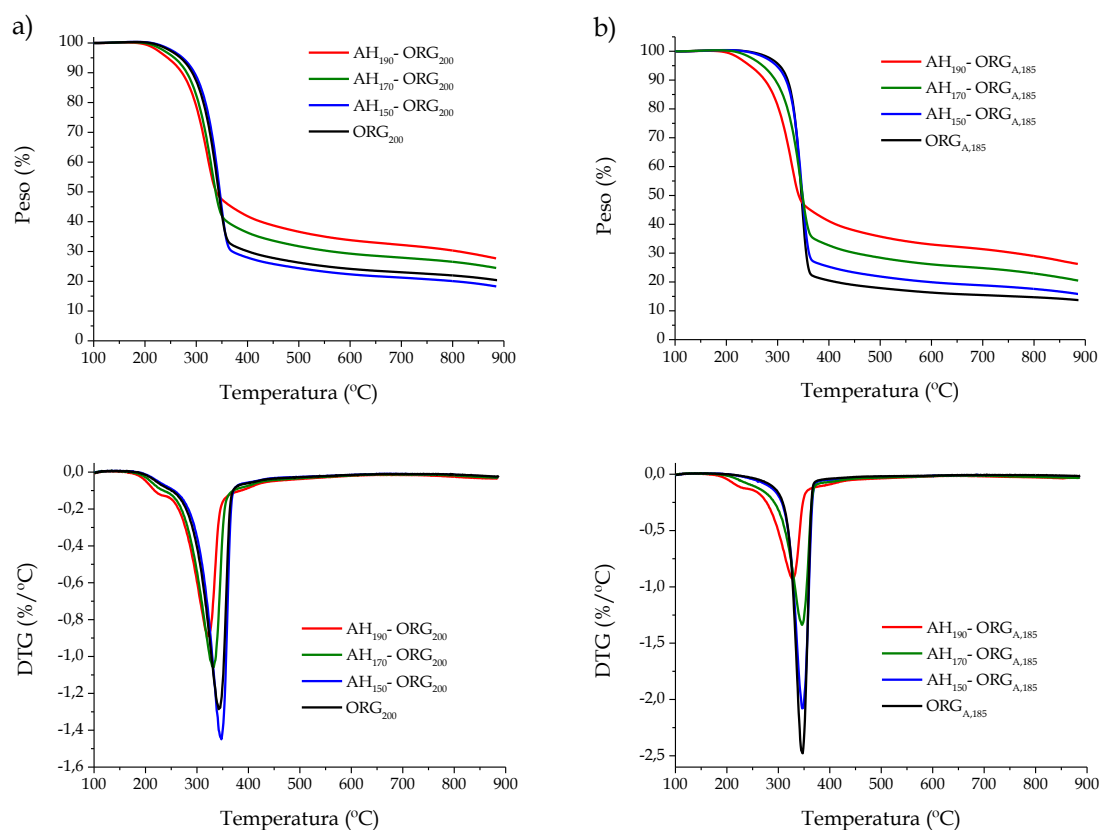


Figura 8.6. Curvas de TGA y DTG de los sólidos de los procesos organosolv y procesos secuenciales: a) Organosolv autocatalítico y b) Organosolv ácido.

Como se ha discutido, los resultados de estabilidad térmica de los sólidos de los procesos organosolv y de las secuencias de tratamientos se pueden asociar con el contenido en fracciones más amorfas. Para confirmar esta relación se representan en la Figura 8.7 los parámetros de degradación térmica elegidos en este estudio, T₁₀ % y cenizas a 800 °C, frente al contenido de la lignina Klason, LI (%), ya que la lignina es un polímero amorfo debido a su estructura ramificada (Henriksson y col., 2010).

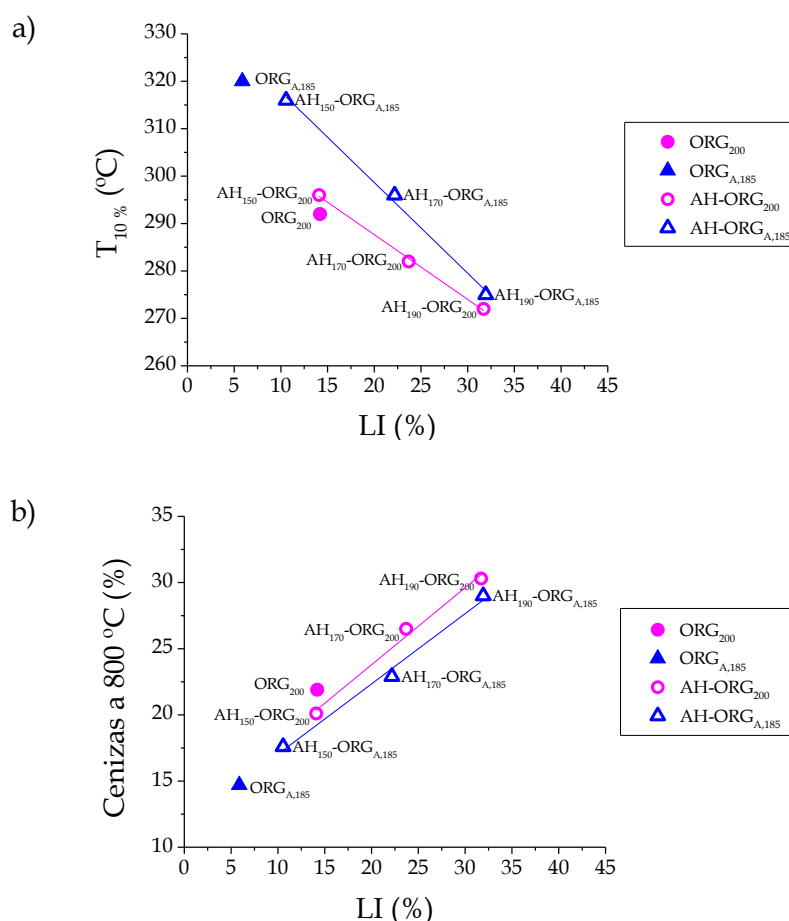


Figura 8.7. Parámetros de degradación térmica frente al contenido en LI (%) de sólidos tratados: a) T₁₀ % y b) Cenizas a 800 °C (%).

En la Figura 8.7 se observa la relación entre los parámetros de degradación y el contenido de lignina Klason del sólido tratado cuando se emplean las mismas condiciones en el proceso organosolv. La T₁₀ % va siendo menor según va incrementando el contenido de lignina Klason, mientras que el porcentaje de cenizas a 800 °C va aumentando. Por tanto, el incremento de la estabilidad térmica del sólido final se asocia con una mayor eliminación de lignina durante el tratamiento organosolv que da lugar a un sólido más rico en celulosa (Chen y col., 2011b; Sun y col., 2015).

Destacar el caso de la secuencia formada por la autohidrólisis a condiciones suaves y el organosolv autocatalítico (AH₁₅₀-ORG₂₀₀) frente al proceso organosolv (ORG₂₀₀), ambos sólidos presentan el mismo porcentaje de lignina Klason (14 %). Sin embargo, la T₁₀ % es mayor para la secuencia que para el proceso aislado, implicando que se trata de un sólido más estable térmicamente. Esta diferencia de estabilidad se debe al menor contenido en hemicelulosas del sólido del ensayo AH₁₅₀-ORG₂₀₀, un 5 %,

frente al 11 % del ensayo ORG₂₀₀, ya que una mayor proporción de este polímero reduce la T₁₀ %. Este hecho se justifica con la relación que se observó en el estudio de la estabilidad térmica de la madera autohidrolizada (epígrafe 6.1.3).

La T₁₀ % del sólido del ensayo AH₁₅₀-ORG₂₀₀ es la misma que la obtenida para el sólido del ensayo AH₁₇₀-ORG_{A,185} (296 °C) a pesar de que el contenido en lignina Klason en estos sólidos sea de un 14 % y un 22 %, respectivamente. Esta diferencia se explica porque la muestra del ensayo AH₁₅₀-ORG₂₀₀, que tiene un menor contenido en lignina en su estructura (14 %), también presenta otros componentes amorfos, las hemicelulosas, que reducen su estabilidad frente a otros sólidos que contienen una mayor proporción de lignina.

El incremento de la estabilidad térmica producida por la eliminación de hemicelulosas y lignina de los materiales lignocelulósicos tras ser sometidos a diferentes tratamientos también fue observado por otros autores. Chen y col. (2011b) comprobaron esta relación al emplear paja de arroz como materia prima y un tratamiento de vapor a alta presión, donde el sólido obtenido presentaba mayores temperaturas de degradación y menor contenido en residuos. Sun y col. (2015) también lo comprobaron con paja de trigo al llevar a cabo un tratamiento organosolv usando una mezcla glicerol/agua como disolvente.

El estudio de la estabilidad térmica de los sólidos obtenidos tras la secuencia de tratamientos ha permitido comprobar que la proporción de polímeros amorfos, hemicelulosas y lignina, en los sólidos tratados determinan su estabilidad térmica. De este modo, los sólidos más ricos en celulosa presentan mayor estabilidad térmica.

8.1.4. Grupos funcionales

El sólido procedente de los procesos organosolv y procesos secuenciales se analiza mediante espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) para determinar los cambios estructurales producidos por el cambio de las condiciones de autohidrólisis. En la Figura 8.8 se muestran los espectros obtenidos, agrupados según la deslignificación organosolv empleada (autocatalítica o ácida). Todas las bandas indicadas en ellos se recogen en la Tabla 5.10, donde se relacionan los grupos funcionales con los componentes de la madera a la que pertenecen.

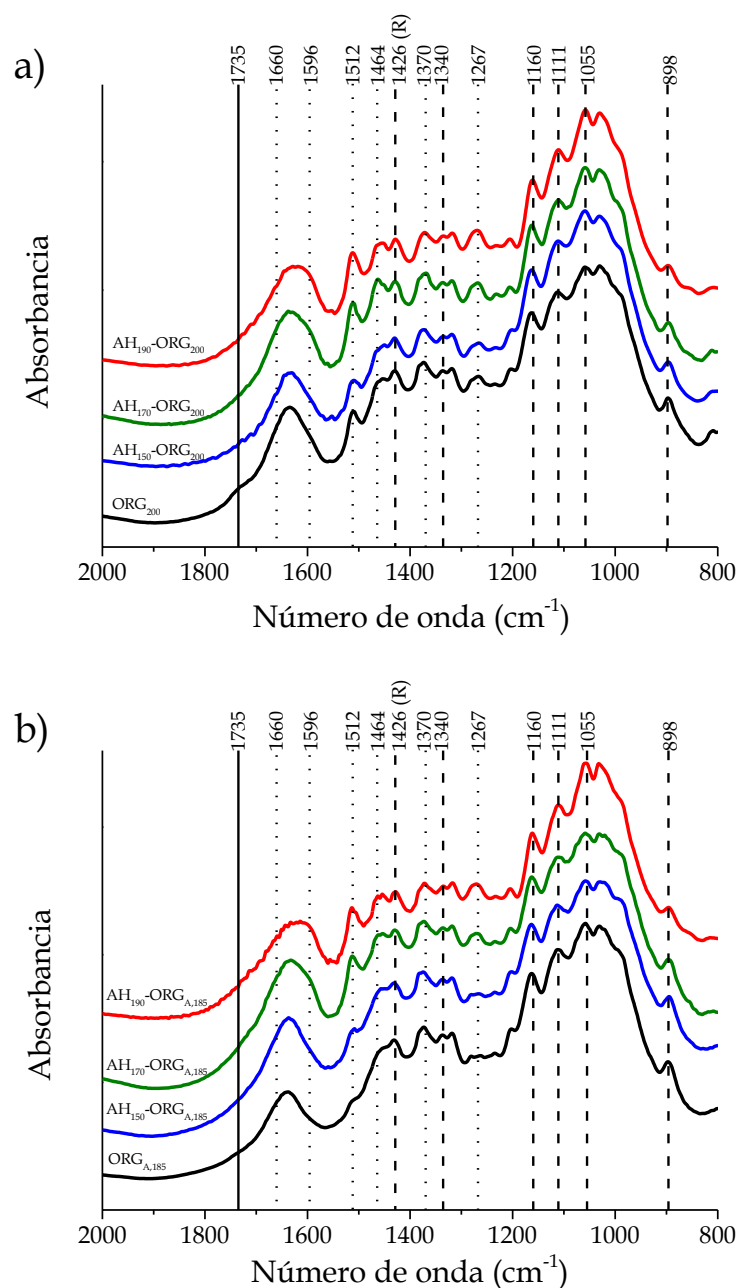


Figura 8.8. Espectros de FTIR de los sólidos de los procesos organosolv y procesos secuenciales: a) Organosolv autocatalítico y b) Organosolv ácido.

Los espectros de los sólidos tratados presentan las bandas típicas de la celulosa y la lignina, mientras que la banda de la hemicelulosa, 1735 cm^{-1} , que corresponde a la vibración del estiramiento del enlace $\text{C}=\text{O}$, no es apreciable. Este resultado se debe a que todas las muestras presentan un bajo contenido en hemicelulosas (menor al 12 %).

Los cambios más significativos de estos espectros se producen en las bandas de lignina: 1596 y 1512 cm^{-1} que corresponden a la vibración del esqueleto aromático con estiramiento en el enlace C=O y C-H, respectivamente, y la banda 1267 cm^{-1} del estiramiento del enlace C=O de los anillos guayacilo.

En los sólidos procedentes de las secuencias de tratamiento organosolv autocatalítico (Figura 8.8a) y los procedentes del ácido (Figura 8.8b), estas bandas de lignina incrementan su intensidad con la severidad de la autohidrólisis. Además, presentan mayor intensidad en comparación con los sólidos de los procesos organosolv (ORG₂₀₀ y ORG_{A,185}). Destacar el caso de la secuencia compuesta por la autohidrólisis a condiciones suaves y la deslignificación autocatalítica (AH₁₅₀-ORG₂₀₀), donde la intensidad de dichas bandas es menor que la del sólido del proceso organosolv autocatalítico (ORG₂₀₀). Para explicar la variación en la intensidad de estas bandas se realiza un análisis semicuantitativo, empleando como banda de referencia la correspondiente al número de onda de 1428 cm^{-1} . En la Tabla 8.2 se muestran los resultados de la relación de absorbancias de dichas bandas.

Tabla 8.2. Análisis semicuantitativo FTIR de los sólidos obtenidos en los procesos organosolv y procesos secuenciales.

Experimento	A_{1596}/A_{1428}	A_{1512}/A_{1428}	A_{1267}/A_{1428}
ORG ₂₀₀	0,9659	0,7323	0,5741
AH ₁₅₀ -ORG ₂₀₀	0,9651	0,6721	0,5386
AH ₁₇₀ -ORG ₂₀₀	0,9912	0,8487	0,6582
AH ₁₉₀ -ORG ₂₀₀	1,0660	0,8905	0,7151
ORG _{A,185}	0,8903	0,5673	0,4380
AH ₁₅₀ -ORG _{A,185}	0,9355	0,6959	0,5696
AH ₁₇₀ -ORG _{A,185}	0,9790	0,8366	0,6916
AH ₁₉₀ -ORG _{A,185}	1,0556	0,8687	0,7236

Los resultados del análisis semicuantitativo concuerdan con la composición previamente determinada de los sólidos procedentes de los procesos organosolv y de los procesos secuenciales (apartado 8.1.2). Los sólidos que presentan mayor intensidad en estas bandas se corresponden con aquellos que presentan un mayor contenido de lignina, debido a su recondensación durante la etapa de autohidrólisis (Timilsena y col., 2013; Pielhop y col., 2015).

8.2. Caracterización de la lejía negra organosolv

La lejía negra obtenida en la deslignificación, tanto en los procesos organosolv como en los procesos secuenciales de tratamientos, se caracteriza mediante la medida del valor de pH y la cuantificación de los azúcares y productos de degradación presentes en ella. A continuación se muestran estos resultados y su discusión.

8.2.1. Determinación del pH

Los valores del pH de la lejía negra de los procesos organosolv (ORG) y los procesos secuenciales autohidrólisis-organosolv (AH-ORG) se recogen en la Tabla 8.3.

Tabla 8.3. Valores del pH de la lejía negra de los procesos organosolv y procesos secuenciales.

Experimento	pH
ORG ₂₀₀	3,99
AH ₁₅₀ -ORG ₂₀₀	4,05
AH ₁₇₀ -ORG ₂₀₀	4,53
AH ₁₉₀ -ORG ₂₀₀	4,63
<hr/>	
ORG _{A,185}	2,69
AH ₁₅₀ -ORG _{A,185}	2,68
AH ₁₇₀ -ORG _{A,185}	2,86
AH ₁₉₀ -ORG _{A,185}	2,82

Los valores del pH de las lejías resultantes del organosolv en condiciones autocatalíticas se encuentran entre 3,99 y 4,63, frente a los valores obtenidos en condiciones ácidas, comprendidos entre 2,69 y 2,86, siendo éstos últimos consecuencia de la adición del ácido sulfúrico. Los valores de pH de las secuencias autohidrólisis-organosolv autocatalítico son próximos a los obtenidos por Huijgen y col. (2012) para la lejía negra procedente de paja de trigo, cuyo intervalo variaba entre 4,2 y 4,6.

Los valores de pH de la lejía negra del organosolv autocatalítico aumentan con el incremento de la severidad de la autohidrólisis (Tabla 8.3). De esta forma, se incrementa el pH desde 3,99 en las condiciones más suaves de autohidrólisis (AH₁₅₀-ORG₂₀₀) hasta 4,63 en las condiciones más severas (AH₁₉₀-ORG₂₀₀). Esta tendencia se justifica por la eliminación de las hemicelulosas durante la autohidrólisis. Como se

comentó en el apartado 6.1, bajo condiciones suaves de tratamiento (AH₁₅₀, 150 °C y 30 min), la extracción de hemicelulosas es limitada, por lo que éstas se mantienen en la fase sólida (madera autohidrolizada). Al someter a dicho sólido a la deslignificación organosolv, las hemicelulosas se hidrolizan y solubilizan en la fase líquida, llegando incluso a degradarse. Los ácidos procedentes de las hemicelulosas, como el ácido acético generado en la liberación de los grupos acetilo y el fórmico por la degradación del furfural, reducen el pH hasta un valor de 4,05 (Hou y col., 2014; Li y col., 2014a; Batalha y col, 2015; Zakaria y col., 2015). De forma contraria, el sólido procedente de la autohidrólisis a condiciones severas (AH₁₉₀, 190 °C y 90 min) apenas presenta hemicelulosas que puedan ser liberadas y degradarse en la fase líquida durante la deslignificación organosolv, por lo que el pH se mantiene en 4,63. Este hecho se discutirá en el apartado 8.2.2 donde se muestran los resultados en la composición de las lejías negras.

En las condiciones del proceso organosolv ácido, tanto en el proceso organosolv solo como en la secuencia autohidrólisis-organosolv, las lejías presentan valores de pH muy similares (2,69-2,86), debido a la presencia del ácido sulfúrico, cuyo efecto sobre el pH predomina frente al contenido en hemicelulosas en la madera autohidrolizada.

A continuación se exponen los resultados de la composición de las lejías negras donde se explican los valores de pH de la lejía negra por la generación de ácidos en el proceso organosolv autocatalítico y la influencia del catalizador sobre la formación de productos de degradación en el proceso organosolv ácido.

8.2.2. Composición

La concentración de los compuestos presentes en las lejías negras de los procesos organosolv (ORG) y procesos secuenciales autohidrólisis-organosolv (AH-ORG), tanto en condiciones autocatalíticas como ácidas, se muestran en la Tabla 8.4. En ellas se han identificado los azúcares, glucosa (Gl), xilosa-manosa-galactosa (X-M-Ga) y los productos de degradación, ácido fórmico (AF), ácido acético (AA), ácido levulínico (AL), hidroximetilfurfural (HMF) y furfural (F).

Tabla 8.4. Concentración de compuestos en la lejía negra de los procesos organosolv y procesos secuenciales (g/L).

Compuesto	Gl	X-M-Ga	AF	AA	AL	HMF	F
ORG ₂₀₀	-	4,28	2,68	4,65	-	2,13	-
AH ₁₅₀ -ORG ₂₀₀	3,5	6,75	-	3,69	-	2,95	0,32
AH ₁₇₀ -ORG ₂₀₀	-	1,55	-	1,54	-	1,11	-
AH ₁₉₀ -ORG ₂₀₀	0,15	0,23	0,38	0,45	-	1,04	-
ORG _{A,185}	12,64	26,41	2,53	4,22	1,23	5,84	2,56
AH ₁₅₀ -ORG _{A,185}	6,18	8,01	-	3,72	1,96	10,71	3,84
AH ₁₇₀ -ORG _{A,185}	2,65	3,62	-	1,76	0,73	6,59	2,09
AH ₁₉₀ -ORG _{A,185}	4,24	3,68	-	-	-	4,66	0,21

-: no detectado

En los procesos organosolv autocatalíticos, la variación de la concentración de ácido acético se produce a la par que lo hacen los valores de pH previamente comentados (apartado 8.2.1). El ensayo con la concentración más elevada de ácido acético (ORG₂₀₀, 4,65 g/L) corresponde con el valor de pH más bajo (3,99), mientras que el ensayo que presenta la concentración más baja (AH₁₉₀-ORG₂₀₀, 0,45 g/L) tiene el valor más alto de pH (4,63). Esta tendencia, como se explica en el apartado 8.2.1, se justifica por la liberación de los grupos acetilo de las hemicelulosas del sólido que se somete a la deslignificación organosolv y la consecuente formación de ácido acético en el medio (Hou y col., 2014; Li y col., 2014a; Batalha y col, 2015; Zakaria y col., 2015). Por tanto, un mayor contenido en hemicelulosas en el sólido da lugar a una mayor liberación de estos grupos a la fase líquida y la mayor caída en los valores de pH.

La reducción de concentración de los azúcares (X-M-Ga) en la lejía negra con el incremento de la severidad de la autohidrólisis, desde 6,75 g/L en AH₁₅₀-ORG₂₀₀ hasta 0,23 g/L en AH₁₉₀-ORG₂₀₀, se justifica con la composición del sólido que se introduce a la deslignificación organosolv. Las condiciones de autohidrólisis más severas (AH₁₉₀, 190 °C y 90 min) dan lugar a un sólido que apenas presenta hemicelulosas y, por tanto, no se pueden liberar a la lejía negra en la etapa organosolv. Sin embargo, la concentración más alta de los azúcares en la lejía negra corresponde al ensayo de autohidrólisis a condiciones suaves y el organosolv autocatalítico (AH₁₅₀-ORG₂₀₀), donde se alcanza 3,50 g/L para la glucosa y 6,75 g/L para la xilosa, manosa y galactosa. Esta secuencia presenta incluso una concentración de azúcares más alta que la obtenida en el proceso organosolv autocatalítico (ORG₂₀₀). Este hecho se debe a que

la eliminación de hemicelulosas que se produce durante la autohidrólisis a condiciones suaves genera la rotura de los enlaces entre la lignina y los carbohidratos que facilita tanto la deslignificación como la liberación de hemicelulosas durante el proceso organosolv (Moniz y col., 2015).

En línea con los resultados de los azúcares, los productos de degradación también presentan el valor más alto en el ensayo AH₁₅₀-ORG₂₀₀. El hidroximetilfurfural (HMF), procedente de la degradación de las hexosas, tiene una concentración de 2,95 g/L y el furfural, el producto de degradación de las pentosas, de 0,32 g/L. Además, es el único ensayo en el cual se detecta furfural. La ausencia de ácido levulínico en los experimentos con el organosolv autocatalítico indica que el HMF, compuesto del cual procede, no se degrada en las las condiciones de operación estudiadas.

Los ensayos realizados bajo condiciones ácidas organosolv presentan concentraciones de azúcares más elevadas con respecto a las condiciones autocatalíticas, ya que la adición del ácido sulfúrico al medio de reacción acelera las reacciones de hidrólisis de las hemicelulosas solubilizadas hacia los azúcares monoméricos que la componen (Gütsch y col., 2012).

Todas las lejías negras procedentes de los procesos organosolv catalizados con ácido, tanto en el proceso organosolv (ORG_{A,185}) como en los procesos secuenciales (AH-ORG_{A,185}), presentan glucosa con una concentración que oscila entre 2,65 y 12,64 g/L. Estos datos reflejan que durante la etapa organosolv ácida se produce la hidrólisis de la celulosa del sólido, dando lugar al incremento de la glucosa en el medio de reacción. Estos resultados están en concordancia con la pérdida de celulosa que previamente se había cuantificado en la caracterización de los sólidos (apartado 8.1.2). La mayor concentración de azúcares en el medio (xilosa, manosa y galactosa) se alcanza en el proceso organosolv ácido (ORG_{A,185}) donde se obtiene 26,41 g/L.

Con respecto a los productos de degradación, el hidroximetilfurfural y el furfural, se generan bajo todas las condiciones de operación del organosolv ácido. Por tanto, el ácido sulfúrico añadido para acelerar la deslignificación del sólido, además de generar la liberación de hexosas y pentosas procedentes de la celulosa y las hemicelulosas por la rotura de los enlaces carbohidratos-lignina, también favorece la degradación de las

mismas en el medio de reacción (Hallac y col., 2010a; Koo y col., 2011). La incorporación de la autohidrólisis a condiciones suaves, favorece la generación de HMF y furfural en el ensayo AH₁₅₀-ORG_{A,185}, alcanzando las mayores concentraciones de estos productos, 10,71 g/L y 3,84 g/L, respectivamente. A diferencia de las condiciones autocatalíticas, en los ensayos organosolv en condiciones ácidas se genera el ácido levulínico, procedente de la degradación del HMF, cuya concentración más alta se alcanza en el experimento AH₁₅₀-ORG_{A,185} (1,96 g/L). La generación de este compuesto está asociada a la deshidratación de las hexosas a HMF y la rehidratación de éste para formar ácido levulínico y fórmico (Rivas y col., 2014). Sin embargo, no se observa la caída de la concentración del HMF, lo que sugiere que sigue formándose a partir de las hexosas a la par que se convierte en ácido levulínico. Dicho ácido también ha sido cuantificado en otros tratamientos organosolv de maderas como *Populus nigra* L. x *P.maximowiczii* o *Pinus contorta* al utilizar condiciones de tratamiento entre 160 y 200 °C, empleando ácido sulfúrico como catalizador (Pan y col., 2007; Kim y Pan, 2010).

Los resultados obtenidos en la caracterización de las leñas negras de la deslignificación organosolv concuerdan con la composición de los sólidos tratados (apartado 8.1.2), ya que la mayor liberación de hemicelulosa y celulosa al medio de reacción da lugar a una mayor concentración de los azúcares en la leña negra. Del mismo modo, las condiciones ácidas en el proceso organosolv favorecen tanto la liberación de los azúcares al medio como la transformación de los mismos a sus productos de degradación correspondientes.

8.3. Caracterización de la lignina organosolv

En este apartado se muestran los resultados obtenidos al analizar las ligninas organosolv precipitadas a partir de las leñas negras de los procesos organosolv (ORG) y de los procesos secuenciales autohidrólisis-organosolv (AH-ORG). En primer lugar se determina gravimétricamente la cantidad de lignina precipitada, se determina la distribución de pesos moleculares y la estabilidad térmica de las mismas.

8.3.1. Cuantificación

La cantidad de lignina precipitada de las leñas negras de los procesos organosolv (ORG_{200} y $ORG_{A,185}$) y de los procesos secuenciales autohidrólisis-organosolv ($AH-ORG_{200}$ y $AH-ORG_{A,185}$), se muestra en la Figura 8.9.

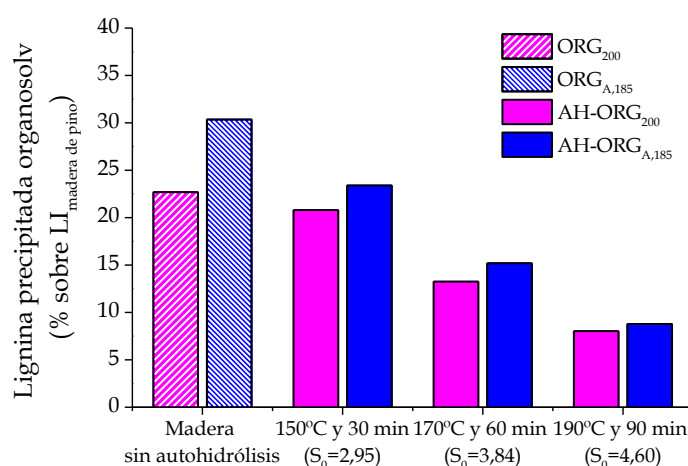


Figura 8.9. Lignina precipitada en los procesos organosolv y procesos secuenciales.

La lignina precipitada organosolv supone entre un 8 y un 30 % de la lignina inicial del pino, es decir, se recupera entre 2 y 8 g por cada 100 g de madera de partida. Estos valores se encuentran próximos a los bibliográficos para esta secuencia de tratamientos con otros materiales lignocelulósicos como especies herbáceas o residuos agrícolas a partir de los cuales se recuperaban entre 6 y 12 g de lignina organosolv (Timilsena y col., 2013; Chen y col., 2016).

La extracción y precipitación de lignina en la deslignificación organosolv en condiciones ácidas es mayor que en la deslignificación en condiciones autocatalíticas. Esta mayor cantidad de lignina precipitada está ligada al grado de deslignificación de los sólidos tratados. En las condiciones ácidas, el catalizador favorece las reacciones de despolimerización de la lignina y su solubilización en el medio de reacción (Jang y col., 2016). También se comprueba que los menores grados de deslignificación en la secuencia de tratamientos autohidrólisis-organosolv se traducen en menores cantidades de lignina organosolv precipitada. La menor extracción y recuperación de lignina se asocia de nuevo a la recondensación de lignina producida en la autohidrólisis, que se acentúa con el incremento de la severidad del tratamiento

(Huijgen y col., 2012). La formación de una lignina más estable en el sólido implica una mayor dificultad de deslignificación, ya que los enlaces creados por la unión de carbonos entre unidades de lignina son más resistentes a su rotura. Esta relación entre la lignina precipitada y la deslignificación del sólido en el proceso organosolv también ha sido observada en otras materias primas tales como residuos de madera de *Buddleja davidii* o paja de trigo (Hallac y col., 2010a; Huijgen y col., 2012).

A la vista de los resultados, se confirma que la recuperación de la lignina organosolv en las secuencias de tratamientos está favorecida por el empleo de condiciones de operación suaves en la autohidrólisis y la adición de un catalizador ácido en la etapa organosolv.

8.3.2. Distribución de pesos moleculares

La lignina organosolv precipitada en los procesos organosolv (ORG) y procesos secuenciales autohidrólisis-organosolv (AH-ORG) se analiza mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) para determinar la distribución de pesos moleculares. Los resultados de estos análisis se recogen en la Tabla 8.5.

Tabla 8.5. Parámetros obtenidos por GPC de la lignina precipitada en los procesos organosolv y procesos secuenciales.

Experimento	M _w (g/mol)	M _n (g/mol)	M _w /M _n
ORG ₂₀₀	2724	204	13,3
AH ₁₅₀ -ORG ₂₀₀	2165	242	8,9
AH ₁₇₀ -ORG ₂₀₀	1882	215	8,7
AH ₁₉₀ -ORG ₂₀₀	1501	110	13,6
ORG _{A,185}	1811	209	8,7
AH ₁₅₀ -ORG _{A,185}	1881	209	9,0
AH ₁₇₀ -ORG _{A,185}	1684	142	11,8
AH ₁₉₀ -ORG _{A,185}	1382	158	8,7

En las muestras de lignina procedentes de los ensayos organosolv autocatalítico (ORG₂₀₀ y AH-ORG₂₀₀), los valores del peso molecular medio varían entre 1501 y 2724 g/mol, mientras que las muestras de organosolv ácido (ORG_{A,185} y AH-ORG_{A,185}), presentan valores menores y varían entre 1382 y 1811 g/mol. Los pesos moleculares medios para las ligninas organosolv procedentes de la secuencia de tratamientos autohidrólisis-organosolv son próximos a los obtenidos para otros materiales

lignocelulósicos como paja de trigo, residuos de palma de aceite o madera de *Eucommia ulmoides*, cuyos valores se encuentran comprendidos entre 1600 y 2800 g/mol (Hussin y col. 2014; Moniz y col., 2015; Zhu y col., 2015; Chen y col., 2016). Estas ligninas de bajo peso molecular pueden ser usadas en múltiples aplicaciones como adhesivos, antioxidantes, pinturas, o ser empleadas como componentes en resinas de fenol-formaldehído (Hussin y col., 2014; Moniz y col., 2015; Tachon y col., 2016). Por ejemplo, Tachon y col. (2016) estudiaron el empleo de una lignina organosolv del proceso CIVM, cuyo peso molecular era de 1900 g/mol, como sustituto del fenol en una resina fenol-formaldehído tipo resol, alcanzando propiedades similares a las resinas estándar.

Para conocer la influencia de las condiciones de operación de la autohidrólisis sobre los pesos moleculares medios de la lignina organosolv, éstos se representan en la Figura 8.10 frente al factor de severidad (S_0) de la etapa de autohidrólisis. También se incluye el valor de los pesos moleculares promedios obtenidos para las ligninas de los procesos organosolv sin autohidrólisis (ORG₂₀₀ y ORG_{A,185}).

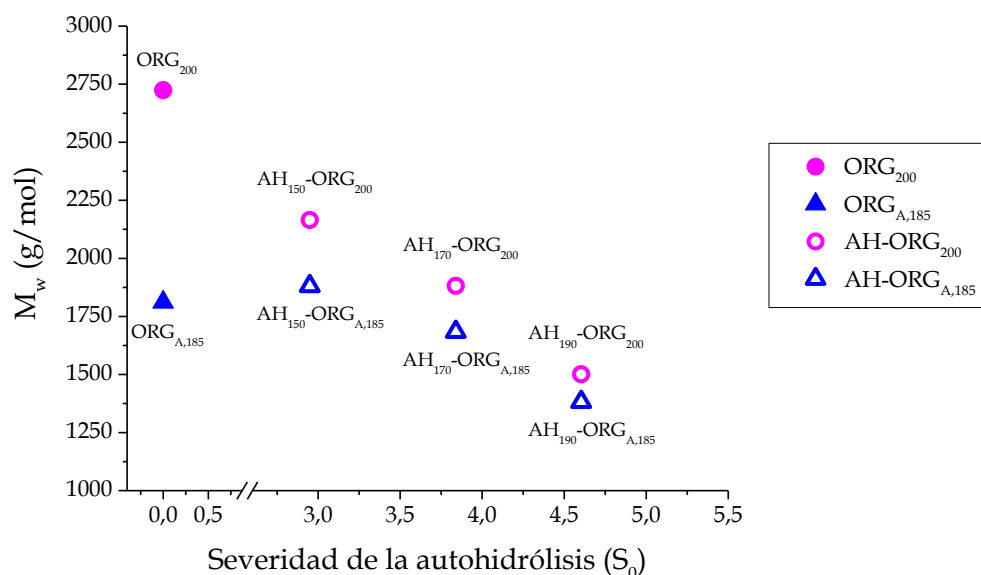


Figura 8.10. Pesos moleculares promedios de la lignina precipitada en los procesos organosolv y procesos secuenciales frente al factor de severidad (S_0) de la autohidrólisis.

El incremento del factor de severidad de la autohidrólisis produce la reducción de los pesos moleculares medios de la lignina precipitada en la deslignificación organosolv. El aumento de la severidad desde 2,95 hasta 4,60 supone una reducción del

M_w de la lignina desde 2165 g/mol (AH₁₅₀-ORG₂₀₀) hasta 1501 g/mol (AH₁₅₀-ORG₂₀₀) cuando se opera en condiciones de organosolv autocatalíticas. La misma tendencia es obtenida al operar empleando condiciones ácidas, bajando el M_w desde 1881 hasta 1382 g/mol, en los ensayos AH₁₅₀-ORG_{A,185} y AH₁₉₀-ORG_{A,185}, respectivamente. Esta reducción del peso molecular medio se justifica por la recondensación de la lignina del sólido que se produce durante la autohidrólisis por la formación de los enlaces C-C. Este tipo de enlaces presentan una mayor estabilidad y son más difíciles de romper (Tejado y col., 2007). Por tanto, la rotura de los enlaces intermoleculares de la lignina da lugar a pequeños fragmentos de lignina con bajos pesos moleculares promedios.

Esta misma disminución de los pesos moleculares medios en la lignina precipitada organosolv tras un proceso secuencial fue observada por Chen y col. (2016). Los pesos moleculares medios de la paja de trigo disminuían desde 2770 g/mol a 1560 g/mol al incrementar la temperatura de la autohidrólisis de 120 °C a 200 °C, manteniendo fijas las condiciones de deslignificación organosolv (90 °C, 2 h y empleando una mezcla etanol/agua al 70 % como disolvente).

Los menores pesos moleculares promedios de la lignina precipitada obtenida en procesos llevados a cabo bajo condiciones ácidas frente a las realizadas en condiciones autocatalíticas, 2724 g/mol del ensayo ORG₂₀₀ frente a 1811 g/mol del ORG_{A,185}, se pueden relacionar con el valor de pH del medio de reacción. El ácido sulfúrico empleado como catalizador para la deslignificación del sólido incrementa la concentración de los iones H⁺ responsables de la rotura de los enlaces de la lignina, dando lugar a fragmentos de ligninas con menor peso molecular (Zhu y col., 2015).

La recondensación de la lignina en maderas durante el tratamiento de autohidrólisis ha sido comprobada por otros autores. Wang y col. (2016) analizaron la lignina de madera molida (*milled wood lignin*, MWL) a partir de la madera autohidrolizada y confirmaron el incremento de los pesos moleculares con la severidad del tratamiento, justificando este hecho por las reacciones de recondensación ocurridas. El peso molecular medio de la lignina de la madera original (*Populus euramericana*) presentaba un valor de 17050 g/mol, que aumentaba hasta 48100 g/mol en la lignina de la madera autohidrolizada a 180 °C. Además, cuantificaron mediante resonancia magnética nuclear (RMN) los enlaces que unían los monómeros de la lignina en dichas

muestras, observando la reducción de los enlaces β -O-4 desde 64,3 hasta 40,2 y el incremento de los enlaces C-C, específicamente del tipo β -5, desde 4,6 a 6,7 (expresados por cada 100 anillos aromáticos). Li y col. (2007) estudiaron el efecto de la despolimerización y repolimerización de la lignina en una madera de álamo temblón (*Populus tremula*) y confirmaron el incremento de los pesos moleculares medios con la reducción de los enlaces β -O-4 de la lignina al aumentar la severidad del tratamiento hidrotérmico. Encontraron que el porcentaje de este tipo de enlaces en la lignina de madera de partida se reducía desde un 54 % hasta un 10 % en la madera tratada a 220 °C.

El estudio de los pesos moleculares medios de las ligninas precipitadas tras la secuencia de tratamientos confirma que, durante la deslignificación organosolv, se liberan fragmentos de lignina de menor peso molecular en aquellas maderas autohidrolizadas bajo condiciones más severas. Este hecho se puede asociar a la generación de enlaces más estables y difíciles de romper producidos durante la autohidrólisis. Además, la incorporación del catalizador ácido al proceso organosolv da lugar a ligninas de menor peso molecular promedio generado por la mayor rotura de los enlaces al incrementar los protones en el medio de reacción.

8.3.3. Estabilidad térmica

Las muestras de la lignina precipitada a partir de las lejías negras de los procesos organosolv (ORG_{200} y $\text{ORG}_{A,185}$) y de los procesos secuenciales autohidrólisis-organosolv (AH-ORG_{200} y $\text{AH-ORG}_{A,185}$) se analiza por TGA para determinar su estabilidad térmica. Las curvas de TGA y sus derivadas se muestran en la Figura 8.11, distinguiendo las ligninas procedentes de los procesos organosolv autocatalítico (Figura 8.11a) y ácido (Figura 8.11b).

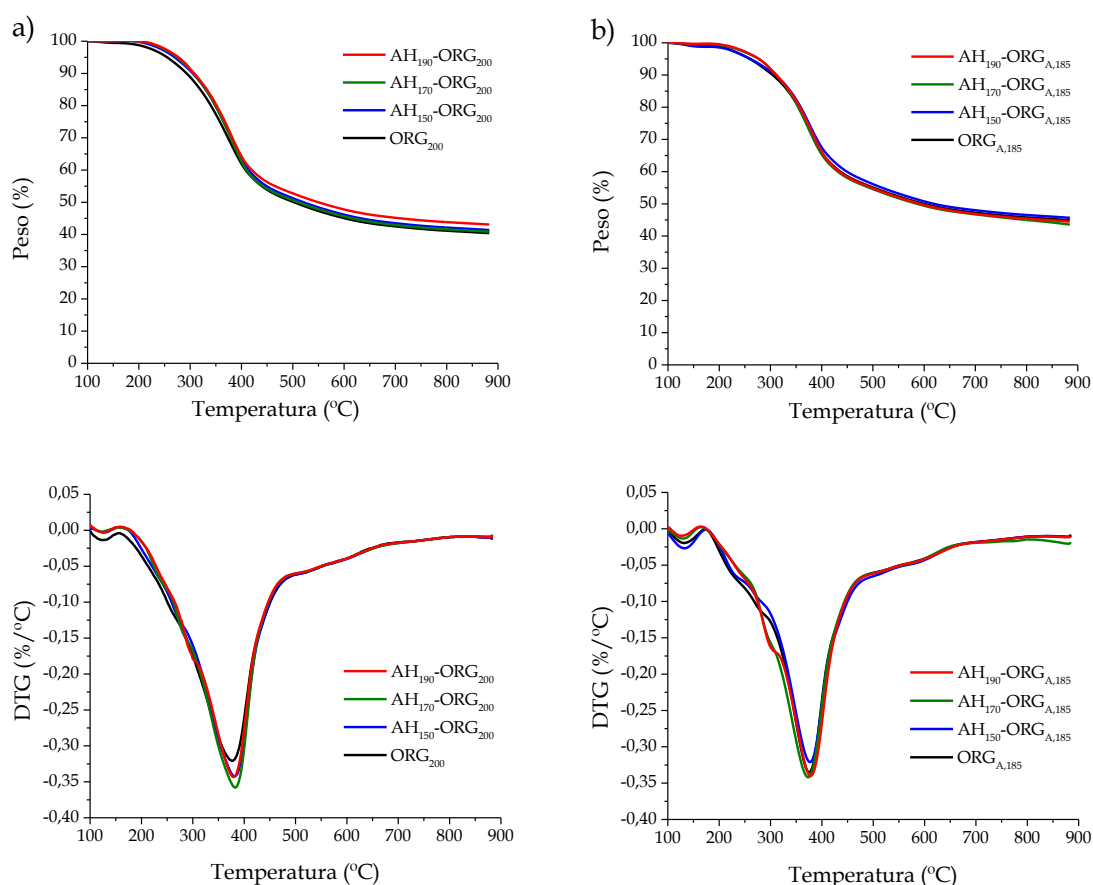


Figura 8.11. Curvas TGA y DTG de la lignina precipitada en los procesos organosolv y procesos secuenciales: a) Organosolv autocatalítico y b) Organosolv ácido.

Las ligninas obtenidas en el proceso organosolv ácido presentan una temperatura de degradación al 25 % y un porcentaje de cenizas a 800 °C mayor que las procedentes de condiciones autocatalíticas. De este modo, la $T_{25\%}$ de las ligninas de condiciones ácidas están en torno 372 °C frente a 364 °C para las del organosolv autocatalítico, mientras que las cenizas presentan un porcentaje de 46 % para las ácidas y un 42 % para las condiciones autocatalíticas. Estos resultados implican que las ligninas organosolv obtenidas en condiciones ácidas presentan una mayor estabilidad térmica que las procedentes de las condiciones autocatalíticas. El mayor porcentaje en cenizas en la lignina se asocia al menor contenido de grupos metoxilo en los anillos aromáticos que la componen, por lo tanto una mayor desmetoxilación da lugar a mayores residuos (Hosseinaei y col., 2016; Wang y col., 2016). Otros autores han justificado este mayor porcentaje de cenizas por la formación de enlaces C-C y C=C insaturados y por un mayor contenido en carbono dando lugar a estructuras más condensadas (Kim y col., 2013; Huijgen y col., 2014; Guo y col., 2015; Tao y col., 2016).

Estos porcentajes de cenizas están en línea con los obtenidos por otros autores para las ligninas procedentes de tratamientos secuenciales autohidrólisis-organosolv a partir de materiales lignocelulósicos como biomasa de palma de aceite o paja de trigo, que se encuentran entre un 40 y 50 % (Hussin y col., 2014; Chen y col., 2016).

En la Figura 8.11 se observa que la degradación de la lignina precipitada organosolv se encuentra principalmente entre los 200 y 700 °C (Barneto y col., 2009; Chen y col., 2016). Este intervalo es el mismo para la procedente de los procesos organosolv aislados como para la obtenida tras la secuencia de tratamientos autohidrólisis-organosolv. Las derivadas de las curvas (DTG) presentan un pico entre los 100 y 180 °C que se puede relacionar con la pérdida de agua enlazada a través de enlaces de hidrógeno con los grupos hidróxilos de la lignina (Hosseinaei y col., 2016). De forma general, la caída de la curva producida entre los 200 y 350 °C corresponde a la rotura de los enlaces β -O-4 por la descomposición térmica de las cadenas alifáticas, por la cual se libera agua y formaldehído (Kim y col., 2013; Wen y col., 2013; Huijgen y col., 2014; Guo y col., 2015; Hosseinaei y col., 2016). A partir de los 300 °C, se produce la liberación de fenoles y metanol debido a la rotura de los enlaces intermoleculares entre los monómeros de la lignina y la rotura de los enlaces metil-aril éter, respectivamente. La rotura de los enlaces carbono-carbono y la degradación del anillo aromático tiene lugar en torno a los 400 °C (Wen y col., 2013; Hosseinaei y col., 2016). Finalmente, entre 400 y 600 °C, se produce el craqueo de los grupos metoxilo de los anillos bencílicos, liberando metano (Wen y col., 2013; Guo y col., 2015; Hosseinaei y col., 2016).

Las curvas obtenidas para las ligninas procedentes del proceso organosolv autocatalítico son muy similares entre sí. Sin embargo, las obtenidas en condiciones ácidas presentan diferencias entre los 200 y 350 °C. Las ligninas de los ensayos AH₁₅₀-ORG_{A,185} y ORG_{A,185} tienen una caída más acusada en torno a los 250 °C, mientras que las correspondientes a los experimentos AH₁₇₀-ORG_{A,185} y AH₁₉₀-ORG_{A,185} lo hace aproximadamente a 300 °C. Esta diferencia se puede relacionar con posibles hemicelulosas residuales en la lignina que también se degradan en el intervalo de temperatura entre los 200 y los 300 °C (Hosseinaei y col., 2016).

A la vista de los resultados de este análisis de estabilidad térmica se comprueba que las ligninas obtenidas en procesos organosolv ácidos son más estables que las

obtenidas bajo condiciones autocatalíticas. Estas condiciones ácidas favorecen la rotura de los enlaces más débiles, dando lugar a ligninas más estables térmicamente. Además, estos resultados están de acuerdo con los menores pesos moleculares promedios obtenidos en estas ligninas. Sin embargo, la incorporación de la etapa previa de autohidrólisis no tiene una influencia muy significativa en la estabilidad térmica.

9. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se exponen los resultados de la hidrólisis enzimática de los ocho sólidos deslignificados obtenidos en los procesos organosolv y en los procesos secuenciales autohidrólisis-organosolv que han sido estudiados en el capítulo anterior. En primer lugar se caracteriza el complejo enzimático usado, Accellerase 1500, para determinar su actividad enzimática del mediante la cuantificación de las proteínas que contiene. A continuación se muestran las curvas de hidrólisis enzimática y los rendimientos obtenidos al emplear los sólidos deslignificados como sustrato en esta etapa final. Se recoge también una comparativa de los resultados alcanzados en el presente trabajo con respecto a los obtenidos con otros materiales lignocelulósicos. Finalmente, se muestran los balances de materia de los diferentes procesos planteados que permitirán seleccionar las condiciones más favorables para el fraccionamiento de la madera de pino.

9.1. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas del complejo enzimático Accellerase 1500 está precedida por la realización de una curva de calibrado con el estándar de proteínas seroalbúmina bovina (BSA). En la Figura 9.1 se muestra la curva de calibrado obtenida al ajustar a una regresión de segundo orden, con un R^2 de 0,999.

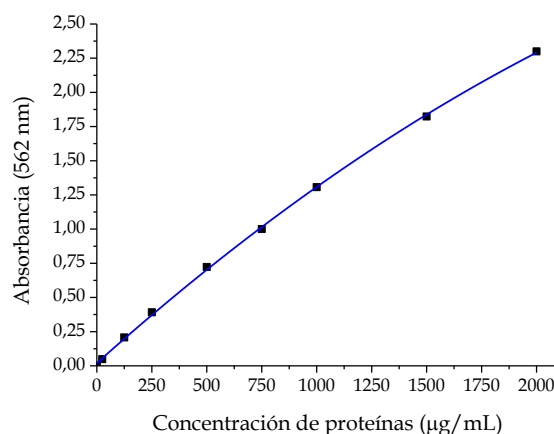


Figura 9.1. Curva de calibrado para el estándar de BSA.

Tras el análisis de la muestra, y teniendo en cuenta su dilución, se determina que el contenido de proteínas del complejo es de $69,0 \text{ mg}_{\text{proteínas}}/\text{mL}_{\text{enzima}}$. Este resultado es similar al obtenido por Zhong y col. (2015), en cuyo estudio cuantificaron que la concentración de proteínas era de $69,7 \text{ mg}_{\text{proteínas}}/\text{mL}_{\text{enzima}}$ para el mismo complejo.

9.2. Rendimiento de la hidrólisis

La concentración de la glucosa liberada a lo largo de las 96 horas de reacción de hidrólisis enzimática de los distintos sólidos deslignificados obtenidos en los procesos organosolv autocatalítico y ácido (ORG_{200} y $\text{ORG}_{A,185}$) y en los procesos secuenciales autohidrólisis-organosolv (AH-ORG_{200} y $\text{AH-ORG}_{A,185}$) se muestra en la Figura 9.2.

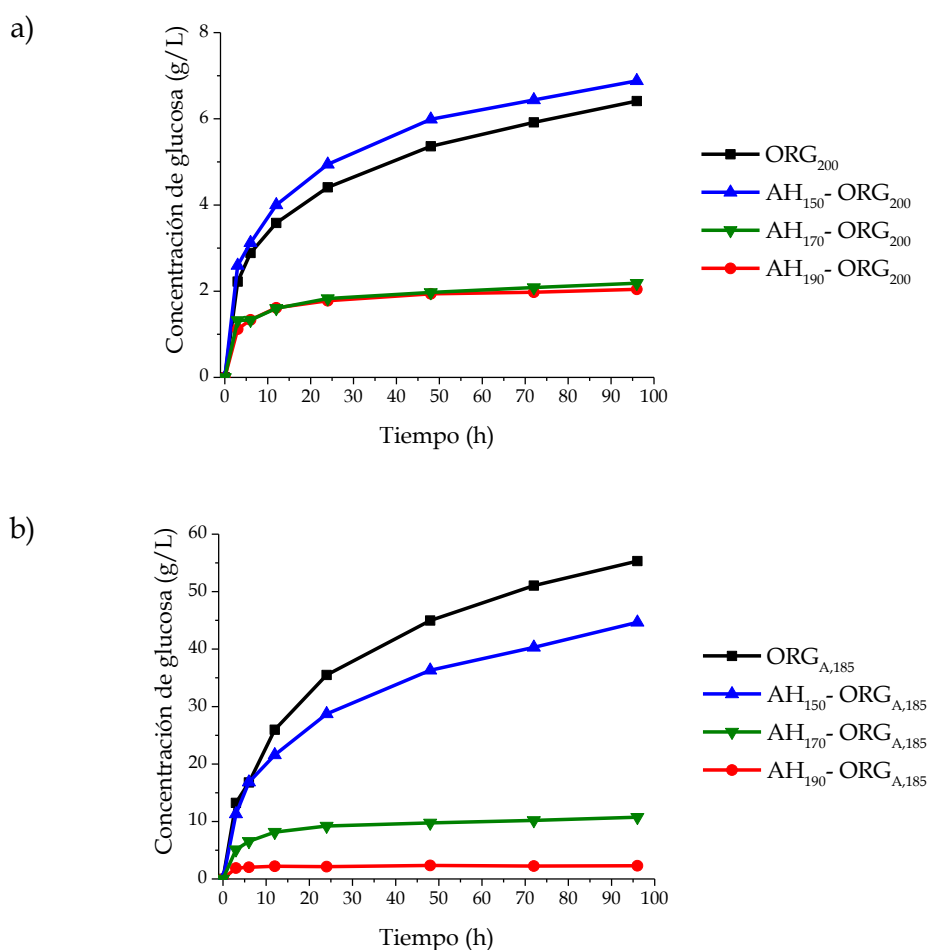


Figura 9.2. Curvas de hidrólisis enzimática de los sólidos de los procesos organosolv y procesos secuenciales: a) Organosolv autocatalítico y b) Organosolv ácido.

Los sólidos procedentes de la deslignificación organosolv catalizada con ácido (Figura 9.2b), bien del proceso organosolv o de los procesos secuenciales, presentan mayor concentración de glucosa que los sólidos de la deslignificación autocatalítica (Figura 9.2a). La máxima concentración de glucosa se alcanza en el sólido del proceso organosolv ácido (ORG_{A,185}) donde se obtiene 55 g/L. En las condiciones autocatalíticas, la máxima concentración se alcanza en el sólido procedente del ensayo secuencial con la autohidrólisis realizadas a condiciones suaves (AH₁₅₀-ORG₂₀₀), llegando solamente a 7 g/L de glucosa.

Los sólidos procedentes de la secuencia autohidrólisis-organosolv ácido presentan un alto contenido en celulosa (65-90 %) como resultado del alto grado de deslignificación conseguido en el tratamiento organosolv (43-94 %) y, por tanto, presentan un menor contenido en lignina. Algunos autores han apuntado hacia la

presencia de este polímero en los sólidos tratados como causa de los bajos rendimientos de hidrólisis enzimática, justificando este hecho por dos motivos: la formación de enlaces no productivos entre la lignina y las enzimas y, por el bloqueo físico que supone la lignina para el acceso de las celulasas a la celulosa (Kim y Han, 2012; Perez-Pimienta y col., 2013; Timilsena y col., 2013; Zhang y col., 2013; Li y col., 2014b; Ko y col., 2015; Saini y col., 2016).

Los enlaces no productivos entre la lignina y la celulosa pueden tener lugar mediante interacciones hidrofóbicas, electrostáticas o enlaces de hidrógeno. Sin embargo, dada la complejidad de la lignina es difícil determinar cual es el que predomina, por lo que se considera que interviene más de una en la formación de estos enlaces no específicos (Saini y col., 2016). Si las enzimas se enlazan de forma no productiva a la lignina, se reduce la disponibilidad de las mismas para la hidrólisis de la celulosa (Karimi y Taherzadeh, 2016b).

Li y col. (2014b) estudiaron el bloqueo que supone la lignina de una madera dura (*Populus trichocarpa*) sobre la hidrólisis de celulosa Avicel. Al llevar a cabo un tratamiento de autohidrólisis, la lignina de la madera se redepositaba en la superficie de la celulosa Avicel. Tras añadir una proteína (BSA) para prevenir los enlaces entre la lignina y la enzima, confirmaron que la inhibición de la hidrólisis enzimática se producía por el bloqueo físico de la lignina, especialmente, en las etapas iniciales de la hidrólisis. Este bloqueo impide el movimiento de las enzimas en la superficie de la celulosa así como el acceso a las capas internas de la misma.

Para comprobar si el rendimiento de hidrólisis enzimática está directamente relacionado con el contenido de lignina Klason en el sustrato, se representa en la Figura 9.3 el rendimiento determinado por la ecuación [5.15] frente al contenido de lignina Klason (%).

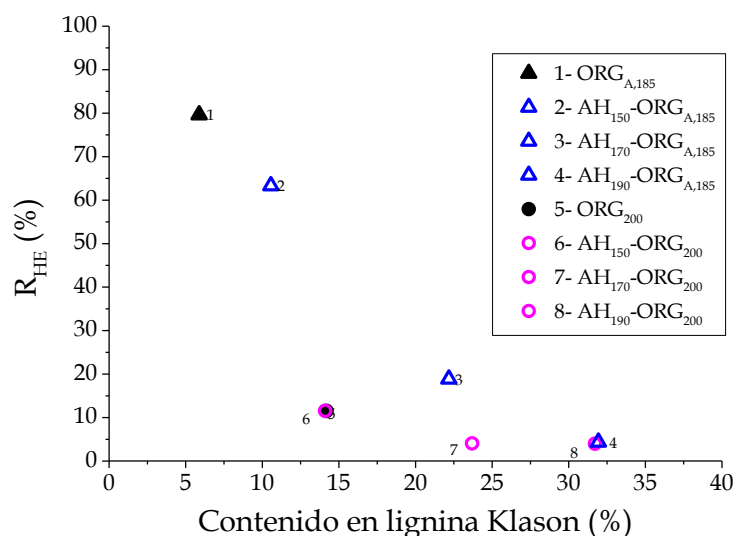


Figura 9.3. Rendimiento de hidrólisis enzimática (%) frente al porcentaje en lignina Klason en los sólidos tratados (%).

Los sólidos procedentes de la deslignificación ácida con menor contenido en lignina presentan el mayor rendimiento de hidrólisis enzimática. El sólido resultante del ensayo ORG_{A,185} alcanza un rendimiento del 80 % con un contenido en lignina Klason del 6 %, mientras que con el sólido de la secuencia formada por la autohidrólisis a condiciones severas y el proceso organosolv ácido (AH₁₉₀-ORG_{A,185}) sólo se consigue un rendimiento del 4 %, al tener un porcentaje de lignina Klason del 32 %. Por tanto, en estos ensayos catalizados por el ácido sulfúrico, la mayor deslignificación favorece el incremento de la hidrólisis enzimática por los factores ya citados. Además, la eliminación de lignina incrementa el área superficial de los sustratos facilitando su digestibilidad (Zhu y col., 2015; Torr y col., 2016).

Sin embargo, en la hidrólisis de los sólidos procedentes de las condiciones de deslignificación autocatalítica, bien del proceso organosolv autocatalítico o de la secuencias autohidrólisis-organosolv autocatalítico, no se observa esta tendencia. A pesar de que los sólidos procedentes de las secuencias con autohidrólisis a condiciones moderadas y severas (AH₁₇₀-ORG₂₀₀ y AH₁₉₀-ORG₂₀₀) presentan una diferencia del 8 % en sus contenidos en lignina Klason, 24 % frente a un 32 %, sus rendimientos de hidrólisis están muy próximos (≈ 4 %). El contenido en lignina del sólido del proceso organosolv autocatalítico (ORG₂₀₀) y el de la secuencia con autohidrólisis a condiciones suaves (AH₁₅₀-ORG₂₀₀), es de un 14 % y ambos sólidos alcanzan un rendimiento de hidrólisis del 11 %. Este resultado es menor al 18 % obtenido por el sólido de la

secuencia autohidrólisis a condiciones moderadas y organosolv ácido (AH₁₇₀-ORG_{A,185}), aun presentando éste un mayor contenido en lignina (22 %). Estos resultados dan idea de que no solamente el contenido en lignina Klason es el factor condicionante en la eficacia de la hidrólisis enzimática. Algunos autores defienden que puede ser la mayor o menor accesibilidad a la celulosa de los sustratos la que influye en el rendimiento de hidrólisis (Rollin y col., 2011; Wiman y col., 2012; Meng y col., 2015; Torr y col., 2016; Brienzo y col., 2017).

Wiman y col. (2012) estudiaron la influencia de la accesibilidad a la celulosa y el contenido en lignina del sólido sobre la digestibilidad enzimática de una madera blanda (píceas), tras emplear explosión con vapor como tratamiento. Al aumentar la temperatura de 194 °C a 220 °C, el contenido de lignina en el sólido se incrementaba desde un 39 % hasta un 48 %. Sin embargo, el rendimiento de la hidrólisis mejoraba desde un 13 % a un 70 %, ya que el área superficial del sustrato, cuantificado por adsorción con N₂ (BET), aumentaba desde el 1,3 hasta 8,2 m²/g_{sólido}. Por tanto, concluyeron la accesibilidad de las enzimas a la celulosa era un factor más importante que el contenido en lignina del sólido a hidrolizar. Rollin y col. (2011) estudiaron dos vías de tratamiento para la hierba *Panicum virgatum*: la impregnación amoniacal acuosa (SAA) y el pretratamiento COSLIF (basado en una secuencia de ácido fosfórico y etanol). La deslignificación alcanzada era del 74 % para el SAA y del 34 % para el COSLIF. Sin embargo, la accesibilidad de estos sólidos, expresada como TSAC (*total substrate accessibility to cellulase*), presentaban los valores de 1,5 m²/g_{biomasa} y 9,6 m²/g_{biomasa}, respectivamente. Dado que la accesibilidad primaba sobre el contenido en lignina, los rendimientos de los sustratos eran de 60 % y 80 %.

Otro de los métodos que estiman la accesibilidad del sustrato empleado en bibliografía es el *Simons' staining*. Mediante la aplicación de dos tintes de distinto color y tamaño molecular que se adsorben en el material pretratado, se estima la relación entre poros de pequeño y gran tamaño. Torr y col. (2016) emplearon este método sobre una madera de pino pretratada con líquidos iónicos. Comprobaron que, al someter a la madera a una temperatura de 120 °C y empleando EmimAc como disolvente, la adsorción de los tintes se incrementaba desde valores menores a 20 mg/g_{biomasa} para ambos tintes en la biomasa sin tratar hasta valores cercanos a 40 mg/g_{biomasa} para el

tinte azul que se adsorbe en pequeños poros, y 140 mg/g_{biomasa} para el tinte naranja que lo hace en poros de mayor tamaño. Además, dado que no observaron ni deslignificación del sólido ni pérdida de cristalinidad en la celulosa en dichos tratamientos, concluyeron que la mayor o menor superficie accesible clave para la hidrólisis. Brienzo y col. (2017) también emplearon este método para relacionar la accesibilidad con los resultados de hidrólisis enzimática que alcanzaron con bagazo de caña de azúcar pretratado con ácido diluido. Encontraron una buena correlación entre el la conversión enzimática a glucosa y la cantidad total de tintes adsorbidos (*Direct Blue* y *Direct Orange*), es decir, el área superficial del material tratado que queda disponible para la acción de la enzima.

Por tanto, se puede confirmar que la presencia de lignina Klason en el sólido es un factor importante en la hidrólisis enzimática, pero no determinante. Existen otros factores, como el área superficial interna y externa, que están involucrados en la eficacia de la hidrólisis enzimática al influir en la accesibilidad del sustrato.

9.3. Comparación con otros materiales

En la Tabla 9.1 se recogen los resultados del presente trabajo sobre el rendimiento de hidrólisis enzimática y los obtenidos por otros autores con materias primas tratadas por la misma secuencia de tratamiento autohidrólisis-organosolv y posterior hidrólisis enzimática.

El experimento del presente trabajo, AH₁₅₀-ORG_{A,185}, corresponde a la secuencia de tratamientos en la que se obtiene el mayor rendimiento en la hidrólisis enzimática con un 63 %. Este porcentaje está muy próximo a los alcanzados por otros materiales como paja de arroz (68,5 %), hierba typha (60 %), *Miscanthus* (60 %), paja de trigo (60 y 64 %) o madera de eucalipto (61 %) como se recoge en la Tabla 9.1. Las condiciones de operación para la etapa organosolv en estos ensayos son similares: temperaturas entre los 170 y 190 °C, empleando una mezcla etanol/agua como disolvente y, en ocasiones, en presencia de un catalizador (Huijgen y col., 2012; Obama y col., 2012; Ruiz y col., 2012; Timilsena y col., 2013).

Tabla 9.1. Rendimientos de hidrólisis enzimática de distintas materias primas en la secuencia de tratamientos autohidrólisis-organosolv.

Fuente	Materia prima	Autohidrólisis	Organosolv	R _{HE} (%)
Moniz y col., 2015	Paja de arroz	T = 210 °C No isoterma	T = 30 °C t = 0-24 h 5-75 % de etanol/agua	68,5*
Timilsena y col., 2013	<i>Miscanthus</i> , residuos de palma de aceite y la hierba typha	T = 150 °C t = 8 h	T = 170 °C t = 60 min 80 % etanol/agua 0,5 % H ₂ SO ₄	48 50 60
Huijgen y col., 2012	Paja de trigo	T = 175 °C t = 30 min	T = 190 °C t = 60 min 60 % etanol/agua	≈ 60
Obama y col., 2012	<i>Miscanthus</i>	T = 150 °C t = 8 h	T = 170 °C t = 60 min 80 % etanol/agua 1 % H ₂ SO ₄	≈ 60
Ruiz y col., 2012	Paja de trigo	T = 180 °C t = 30 min	T = 180 °C t = 20 min 40 % etanol/agua 0,1 % NaOH	64
Romaní y col., 2011	Madera de eucalipto	T = 195-205 °C No isoterma	T = 175-200 °C t = 60-120 min 60 % de etanol/agua	39,4-60,9
Este trabajo	Madera de pino	T = 150 °C t = 30 min	T = 185 °C t = 75 min 50 % etanol/agua 1 % H ₂ SO ₄	63

*Promedio de todos los ensayos organosolv

Los resultados obtenidos de hidrólisis enzimática están acorde a los conseguidos por otros materiales lignocelulósicos sometidos a esta misma secuencia de tratamientos. Sin embargo, cabe destacar la dificultad de deslignificación de la materia prima empleada en este trabajo. Su elevado contenido en lignina y el tipo de enlace que une los monómeros que la componen hacen que la eliminación de este polímero resulte más complicada, así como la mejora de la conversión de la celulosa a glucosa. Por tanto, se puede considerar que el ensayo AH₁₅₀-ORG_{A,185} empleado para la madera de *Pinus radiata* alcanza un buen rendimiento en la hidrólisis enzimática de la celulosa presente en ella para la obtención de glucosa.

9.4. Selección de la secuencia de tratamientos autohidrólisis-organosolv

Para seleccionar la secuencia de tratamiento autohidrólisis-organosolv más adecuada, desde el punto de vista del fraccionamiento de madera de *Pinus radiata*, se tienen en cuenta los parámetros que se recogen en Tabla 9.2. Dichos parámetros son: el porcentaje de las hemicelulosas extraídas durante la primera etapa de autohidrólisis, el grado de deslignificación obtenido en el proceso organosolv (GD), los sólidos resultantes tras el proceso secuencial (ST), el porcentaje de celulosa en el sólido que se emplea como sustrato en la hidrólisis enzimática (C_{ST}) y el rendimiento de esta última (R_{HE}).

Tabla 9.2. Parámetros para el estudio de los tratamientos secuenciales.

Experimento	Extracción de hemicelulosas (%)	GD (%)	ST (g/100 g de pino)	C_{ST} (%)	R_{HE} (%)
ORG ₂₀₀	0	70,0	56,2	69,6	11,5
AH ₁₅₀ -ORG ₂₀₀	20	75,8	45,7	75,3	11,5
AH ₁₇₀ -ORG ₂₀₀	62	53,2	52,5	65,5	4,1
AH ₁₉₀ -ORG ₂₀₀	88	36,0	53,7	65,2	4,0
ORG _{A,185}	0	93,6	28,9	89,8	79,6
AH ₁₅₀ -ORG _{A,185}	20	88,0	30,2	87,6	63,3
AH ₁₇₀ -ORG _{A,185}	62	65,2	41,8	72,3	18,9
AH ₁₉₀ -ORG _{A,185}	88	43,2	47,3	65,3	4,4

Entre las diferentes secuencias de tratamientos planteadas con el proceso organosolv autocatalítico, los mejores resultados se alcanzan con la secuencia AH₁₅₀-ORG₂₀₀, es decir, la autohidrólisis a condiciones suaves (150 °C y 30 min) seguida del proceso organosolv autocatalítico (200 °C, 100 min y 50 % de etanol). Además de recuperar un 20 % de las hemicelulosas iniciales de la madera de pino, la cantidad de sólido tratado que se obtiene para emplearlo como sustrato en la hidrólisis enzimática es de aproximadamente 46 g/100 g de la madera inicial. El sólido resultante presenta un alto grado de deslignificación (≈ 76 %) con un contenido en celulosa superior al 75 %. A pesar de estos buenos resultados desde el punto de vista de fraccionamiento, solamente alcanza un 12 % de rendimiento en la hidrólisis enzimática.

Los resultados alcanzados por las secuencias de tratamientos que emplean ácido en la etapa organosolv son mejores que los obtenidos en aquellas en las que el proceso organosolv es autocatalítico. Los grados de deslignificación son superiores, encontrándose en un intervalo entre 44 y 94 % frente al intervalo 36 y 70 % del proceso autocatalítico. Los sólidos deslignificados presentan un mayor contenido en celulosa, comprendida entre 65 y 90 % para el proceso ácido frente al 65 y 75 % del autocatalítico. Además, se obtiene mayor conversión de celulosa a glucosa. Por tanto, respecto a los dos procesos organosolv estudiados, el catalizado con el ácido sulfúrico ofrece mejores resultados en lo relativo a grados de deslignificación y rendimientos de hidrólisis enzimática frente al organosolv autocatalítico, independientemente de las condiciones de autohidrólisis empleadas.

Conviene tener en cuenta que un alta deslignificación del sólido también conlleva una menor cantidad de sólidos tratados para ser sometidos a la hidrólisis enzimática, es decir, la mayor eliminación de lignina va asociada a la pérdida de parte de la celulosa del sólido deslignificado que se pretende mantener para la etapa de hidrólisis. Por ejemplo, con los ensayos $ORG_{A,185}$ y $AH_{150}-ORG_{A,185}$, se alcanzan los mayores grados de deslignificación, próximos al 90 %, pero la cantidad de sólido tratado final se encuentra alrededor de 30 g/100 g de madera pino inicial. Entre los diferentes ensayos con un proceso organosolv ácido, los mejores resultados en cuanto a grado de deslignificación, porcentaje de celulosa en el sólido y rendimiento de hidrólisis se refiere, son los obtenidos con el proceso sin autohidrólisis previa ($ORG_{A,185}$), realizado bajo las condiciones correspondientes a 185 °C, 75 min, 50 % de etanol y 1 % de H_2SO_4 . Sin embargo, el inconveniente que presenta no incorporar la etapa de autohidrólisis es que las hemicelulosas de la madera se solubilizan en la lejía negra del proceso organosolv, lo que dificulta su recuperación posterior.

Con el objetivo de determinar qué secuencia de tratamientos es la más adecuada, se completa el análisis de los parámetros de la Tabla 9.2 con la Tabla 9.3. En la que muestran las fracciones de la madera de pino (hemicelulosa, celulosa y lignina) recuperadas tras la separación de las mismas en los tratamientos secuenciales.

Tabla 9.3. Fracciones recuperadas en los tratamientos secuenciales (g/100 g de madera).

Experimento	Hemicelulosa (g)			Lignina (g)	Glucosa (g)
	Oligosacáridos	Monosacáridos	Productos de degradación		
ORG ₂₀₀	0	0	0	6,0	4,5
AH ₁₅₀ -ORG ₂₀₀	4,3	0,8	0,5	5,5	4,1
AH ₁₇₀ -ORG ₂₀₀	11,0	4,4	1,2	3,5	1,4
AH ₁₉₀ -ORG ₂₀₀	3,3	7,7	6,5	2,1	1,4
ORG _{A,185}	0	0	0	8,1	20,7
AH ₁₅₀ -ORG _{A,185}	4,3	0,8	0,5	6,2	17,1
AH ₁₇₀ -ORG _{A,185}	11,0	4,4	1,2	4,0	5,7
AH ₁₉₀ -ORG _{A,185}	3,3	7,7	6,5	2,3	1,4

A la vista de los resultados expuestos se comprueba que el ensayo de autohidrólisis más favorable para la recuperación de hemicelulosas es el realizado a condiciones moderadas (AH₁₇₀, 170 °C y 60 min). Bajo estas condiciones se consigue una corriente rica en hemicelulosas que puede ser empleada posteriormente, a diferencia de la obtenida en la etapa de autohidrólisis realizada bajo condiciones más severas (AH₁₉₀, 190 °C y 90 min), cuya fase líquida presenta una mayor cantidad de productos de degradación. Sin embargo, esta buena recuperación de hemicelulosas a condiciones moderadas no va asociada a conseguir altas recuperaciones de los otros componentes de la madera, lignina y celulosa en forma de glucosa. Las cantidades más altas de lignina y celulosa se obtienen en los procesos secuenciales que emplean autohidrólisis a condiciones suaves o se realizan en ausencia de dicha etapa. Por ejemplo, en el ensayo AH₁₇₀-ORG_{A,185} se recuperan 4 g de lignina y 6 g de celulosa por cada 100 g de madera de pino, mientras que en el AH₁₅₀-ORG_{A,185} se consigue 6,2 y 17,1 g, respectivamente.

De todos los procesos estudiados, y a la vista de lo discutido, la mejor secuencia para la mayor recuperación de fracciones de la madera de pino y un rendimiento aceptable de la hidrólisis enzimática es la formada por una etapa de autohidrólisis empleando condiciones suaves (150 °C y 30 min) y un proceso organosolv catalizado por ácido sulfúrico (185 °C, 75 min, 50 % de etanol y 1 % de H₂SO₄), cuyo fraccionamiento se muestra en la Figura 9.4.

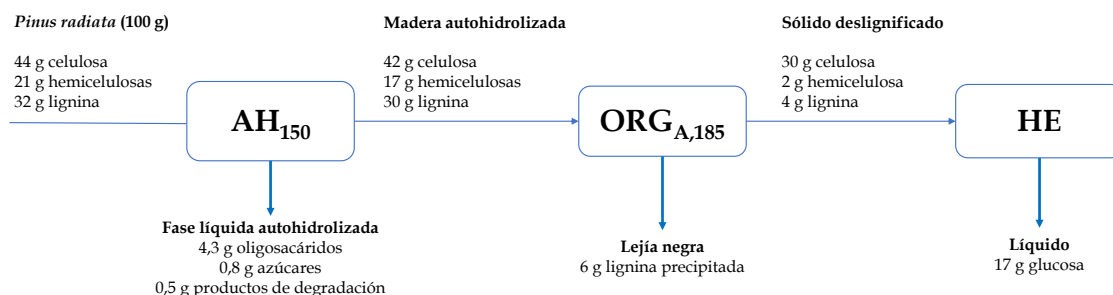


Figura 9.4. Esquema del fraccionamiento de madera de pino con la secuencia AH₁₅₀-ORG_{A,185}.

Este ensayo, AH₁₅₀-ORG_{A,185}, da lugar a un sólido con un contenido en celulosa cercano al 90 %, una alta deslignificación (88 %) y un buen rendimiento en la etapa final de hidrólisis enzimática (63 %). Además, permite la recuperación de un 20 % de las hemicelulosas de la madera de pino en la primera etapa de autohidrólisis (AH₁₅₀, 150 °C y 30 min) y presenta la ventaja de que las hemicelulosas se encuentran principalmente en forma de oligosacáridos y monosacáridos, ya que no se han transformado a sus productos de degradación.

Como se ha discutido en la presente memoria, la etapa de autohidrólisis que da lugar a mayor extracción de hemicelulosas lleva asociada reacciones de recondensación durante la misma, dando lugar a una lignina más estable y difícil de eliminar en el proceso organosolv. Por tanto, tras el proceso organosolv, se obtiene un sólido menos rico en celulosa que presenta un menor rendimiento en la hidrólisis enzimática, limitando así, la recuperación de estas fracciones. Un posible planteamiento para solucionar este inconveniente generado en la autohidrólisis sería la adición de un nucleófilo durante dicha etapa (El Hage y col., 2010; Timilsena y col., 2013; Pielhop y col, 2015). De esta forma, sin que se mermara la recuperación de las hemicelulosas, se podría conseguir la deslignificación alcanzada en los procesos organosolv sin etapa previa de autohidrólisis, así como sus rendimientos en la etapa final de hidrólisis enzimática.

10. CONCLUSIONES

10. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación y de su discusión se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Autohidrólisis

- El tratamiento de autohidrólisis permite la extracción de las hemicelulosas de la madera de *Pinus radiata*, mientras que la celulosa y la lignina prácticamente permanecen en la madera autohidrolizada. Estas hemicelulosas se solubilizan principalmente en forma de oligosacáridos en la fase líquida.
- El incremento de la severidad del tratamiento mejora la extracción de las hemicelulosas de la madera de pino, siendo el efecto de la temperatura del tratamiento más significativo que el del tiempo. Además, da lugar a la conversión de las hemicelulosas ya solubilizadas a productos de degradación.

-
- La estabilidad térmica de la madera autohidrolizada aumenta con la eliminación de las hemicelulosas.
 - El valor del pH de la fase líquida autohidrolizada se reduce con el incremento de la temperatura y el tiempo de tratamiento por la formación de ácidos procedentes de la degradación de la hemicelulosa solubilizada.
 - Las condiciones para el tratamiento de autohidrólisis que dan lugar a la máxima recuperación de hemicelulosas de la madera, sin que éstas se encuentren degradadas en la fase líquida son: 170 °C y 60 min, obteniendo una concentración de 12,7 g/L de oligosacáridos, 5,4 g/L de monosacáridos y 1,6 g/L de productos de degradación.

2. Proceso organosolv

- El proceso organosolv permite la deslignificación de la madera de *Pinus radiata*, hasta un grado de deslignificación de 75 %.
- Las condiciones que permiten el mayor grado de deslignificación y la mayor eliminación de las hemicelulosas, dando lugar a un sólido deslignificado rico en celulosa, son temperaturas y tiempos altos (200 °C y 100 min) y concentraciones de etanol bajas (40 %).
- La estabilidad térmica del sólido deslignificado se incrementa a medida que el contenido en lignina y hemicelulosas disminuye.
- El valor del pH de la lejía negra es más bajo cuanto menor es la concentración de alcohol en el medio y cuanto mayor es la temperatura y el tiempo de operación. Estas condiciones favorecen la hidrólisis de las hemicelulosas, pero también la formación de los productos de degradación a partir de ellas.
- La recuperación de la lignina extraída se incrementa con el aumento de la severidad del tratamiento y la máxima precipitación se consigue con un 55 % de concentración de etanol en el disolvente de partida.
- El peso molecular promedio de la lignina organosolv se reduce con la intensidad de tratamiento, a la par que se incrementa la estabilidad térmica de la misma.

- Las condiciones del proceso organosolv más favorables con las que se alcanza un sólido rico en celulosa (69,6 %), una alta deslignificación (70 %) y una buena recuperación de la lignina extraída (32,2 %) son: 50 % de etanol, 200 °C y 100 min.

3. Tratamiento secuencial autohidrólisis-organosolv

- El incremento de la severidad del tratamiento de la etapa de autohidrólisis reduce la deslignificación de la madera durante el proceso organosolv al favorecer las reacciones de recondensación de la lignina del sólido.
- La adición de ácido sulfúrico como catalizador en el proceso organosolv favorece la deslignificación y la obtención de un sólido rico en celulosa.
- La estabilidad térmica del sólido tratado se reduce con el incremento del contenido de las fracciones amorfas del mismo, especialmente con el de la lignina Klason.
- El valor del pH de la lejía negra del proceso organosolv autocatalítico es mayor según se incrementa la severidad de la autohidrólisis, ya que las hemicelulosas se eliminan durante la misma y no se hidrolizan durante el proceso organosolv. La lejía negra del proceso organosolv catalizado presenta una mayor concentración de azúcares y productos de degradación debido a la acción del ácido sulfúrico.
- Las condiciones empleadas en la etapa de autohidrólisis prácticamente no influyen en la estabilidad térmica de la lignina precipitada organosolv en la secuencia de tratamientos.
- El peso molecular promedio de la lignina precipitada organosolv de la secuencia de tratamientos se reduce con el incremento de la severidad de la autohidrólisis, desde 2165 g/mol en condiciones suaves hasta 1501 g/mol en condiciones severas. En cambio, la adición del catalizador en la deslignificación da lugar a una lignina organosolv con menor peso molecular promedio, 1881 g/mol y 1382 g/mol, para dichas condiciones de autohidrólisis.

4. Hidrólisis enzimática de los sólidos tratados

- El rendimiento de la hidrólisis enzimática del sólido procedente de la secuencia de tratamientos se incrementa con la adición del catalizador ácido al proceso organosolv, debido a los mejores grados de deslignificación obtenidos. Los bajos rendimientos de hidrólisis enzimática de los sólidos procedentes de la secuencia con el organosolv autocatalítico se deben a una baja accesibilidad de los sólidos.
- La secuencia formada por una etapa de autohidrólisis realizada a condiciones suaves (150 °C y 30 min) y un proceso organosolv catalizado por ácido sulfúrico (185 °C, 75 min, 50 % de etanol y 1 % de H₂SO₄) presenta los mejores resultados para la recuperación de las fracciones, alcanzando un rendimiento de hidrólisis enzimática del 63 %.

11. NOMENCLATURA

11. NOMENCLATURA

AFEX	Explosión con amoníaco
A	Arabinosa
AA	Ácido acético
AF	Ácido fórmico
AH	Tratamiento de autohidrólisis
AH ₁₅₀	Tratamiento de autohidrólisis (150 °C y 30 min)
AH ₁₇₀	Tratamiento de autohidrólisis (170 °C y 60 min)
AH ₁₉₀	Tratamiento de autohidrólisis (190 °C y 90 min)
AH-ORG	Proceso secuencial autohidrólisis-organosolv
AL	Ácido levulínico
AminCl	Líquido iónico cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio
AO	Arabinooligosacáridos
ARP	Percolación de amoníaco reciclado

<i>b</i>	Coeficiente de la regresión múltiple
BET	Modelo Braunauer-Emmett-Teller
BG	β -glucosidasas
BmimCl	Líquido iónico cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio
BPC	Bioproceso consolidado
BSA	Seroalbúmina bovina
C	Concentración de etanol (%)
C _{AH}	Contenido en celulosa de la madera autohidrolizada (%)
CBH	Celobiohidrolasas
CBM	<i>Carbohydrate-binding module</i>
C _{ORG}	Contenido en celulosa del sólido deslignificado (%)
C _{EtOH}	Concentración de etanol en el proceso organosolv (%)
COSLIF	Pretratamiento basado en secuencia de ácido fosfórico y etanol
C _{ST}	Celulosa del sólido tratado empleado como sustrato en HE (g)
CTMP	<i>Chemi-termomechanical pulping</i>
DMF	Dimetilformamida
DTG	Derivada del análisis termogravimétrico
EG	Endoglucanasas
EmimAc	Líquido iónico acetato de 1-etil-3-metilimidazolio
EmimCl	Líquido iónico cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
<i>F</i>	Valor de distribución de Fisher
FFKM	Perfluoroelastómero
FPU	Unidades de medida para actividad enzimática (<i>Filter unit paper</i>)
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier
g.l.-efecto	Grados de libertad del efecto
g.l.-error	Grados de libertad del error
Ga	Galactosa
Ga _{AH}	Contenido en galactano de la madera autohidrolizada (%)
GaO	Galactooligosacáridos
Ga _{ORG}	Contenido en galactano del sólido deslignificado (%)
GD	Grado de deslignificación (%)
Gl	Glucosa

GLO	Glucooligosacáridos
GP	Grado de polimerización
GPC	Cromatografía de permeación en gel
HE	Hidrólisis enzimática
HFS	Hidrólisis y la fermentación separada
HMF	Hidroximetilfurfural
HMC _{ORG}	Hemicelulosas del sólido deslignificado (%)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IEA	Agencia Internacional de la Energía
IFM	Inventario Forestal Nacional
IR	Pureza de análisis de infrarrojo
IV	Viscosidad intrínseca
k	Número de factores en diseño de experimentos
KBr	Bromuro potásico
K _{DP}	Constante del detector de viscosidad
K _{RI}	Constante del detector del índice de refracción
L	Lumen
LCC	<i>Lignin-carbohydrate complex</i>
LI	Lignina insoluble
LI _{AH}	Contenido en lignina insoluble de la madera autohidrolizada (%)
LiBr	Bromuro de litio
LI _{ORG}	Contenido en lignina insoluble del sólido deslignificado (%)
LI _{pino}	Contenido en lignina insoluble de la madera de pino (%)
L _{P-ORG}	Lignina organosolv precipitada a partir de la lejía negra
LS	Lignina soluble
LS _{AH}	Contenido en lignina soluble de la madera autohidrolizada (%)
LS _{ORG}	Contenido en lignina soluble del sólido deslignificado (%)
M	Lámina media
m	Masa (g)
M	Manosa
M _{AH}	Contenido en manano de la madera autohidrolizada (%)
MaO	Mananoligosacáridos
MC _{efecto}	Media de cuadrados de cada efecto

MC_{error}	Error cuadrático medio
M_n	Peso molecular promedio en número (g/mol)
M_{ORG}	Contenido en manano del sólido deslignificado (%)
M_p	Pico de peso molecular (g/mol)
m_{pino}	Cantidad de madera de pino inicial (g)
$m_{\text{ST-ORG}}$	Cantidad de sólido tratado obtenido tras el organosolv (g)
M_w	Peso molecular promedio en peso (g/mol)
M_w/M_n	Polidispersidad
n	Número de ensayos en diseño de experimentos
NREAPs	<i>National Renewable Energy Action Plans</i>
NREL	Laboratorio Nacional de Energías Renovables
ORG	Proceso organosolv
ORG ₂₀₀	Proceso organosolv autocatalítico (200 °C, 100 min y 50 % etanol)
ORG _{A-185}	Proceso organosolv ácido (185 °C, 75 min, 50 % etanol y 1 % H ₂ SO ₄)
P	Valor de probabilidad
P	Pared primaria
PAN	Poliacrilonitrilo
PEG	Polietilenglicol
PEO	Polietileno
PET	Tereftalato de polietileno
pH _{AH}	Valor del pH de la fase líquida de la autohidrólisis
pH _{ORG}	Valor del pH de la lejía negra del proceso organosolv
PLA	Ácido poliláctico
PS-DVB	Polimérico estireno-divinilbenceno
PS-H	Poliestireno de alto peso molecular
R	Banda de referencia para el análisis semicuantitativo de FTIR
RMN	Resonancia magnética nuclear
r.p.m.	Revoluciones por minuto
R^2	Coeficiente de correlación
R_{HE}	Rendimiento de hidrólisis enzimática (%)
RID	Detector de índice de refracción
S	Subcapa de la pared secundaria
S_0	Factor de severidad

SAA	Impregnación amoniacal acuosa
SC _{efecto}	Suma de cuadrados del efecto
SC _{error}	Suma de cuadrados del error
SCFS	Sacarificación y co-fermentación simultánea
SC _{regresión}	Suma de cuadrados de la regresión
SC _{total}	Suma de cuadrados total
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SFS	Sacarificación y fermentación simultánea
ST	Sólidos totales tras el tratamiento
ST _{AH}	Sólidos totales tras la autohidrólisis (%)
ST _{ORG}	Sólidos totales tras el proceso organosolv (%)
T	Temperatura (°C)
t	Tiempo (min)
T(t)	Perfil de temperatura durante la calefacción
T'(t)	Perfil de temperatura durante el enfriamiento
T _{10 %}	Temperatura de degradación al 10 % (°C)
T _{10 %-AH}	Temperatura de degradación al 10 % de la madera autohidrolizada (°C)
T _{10 %-ORG}	Temperatura de degradación al 10 % del sólido deslignificado (°C)
T _{25 %}	Temperatura de degradación al 25 % de la lignina organosolv (°C)
t _F	Tiempo total de calefacción y enfriamiento (min)
TGA	Análisis termogravimétrico
T _{max}	Temperatura de degradación máxima (°C)
T _{max-AH}	Temperatura de degradación máxima en madera autohidrolizada (°C)
T _{max-ORG}	Temperatura de degradación máxima en sólido deslignificado (°C)
t _{max}	Tiempo de calefacción (min)
X	Variable independiente en modelo polinómico
X	Xilosa
X _{AH}	Contenido en xilano de la madera autohidrolizada (%)
XO	Xilooligosacáridos
X _{ORG}	Contenido en xilano del sólido deslignificado (%)
Y	Respuesta estudiada en modelo polinómico

Símbolos griegos

α	Parámetro correspondiente al punto axial
ω	Parámetro empírico con valor igual a 14,75

12. BIBLIOGRAFÍA

12. BIBLIOGRAFÍA

Abraham, R.E.; Vongsvivut, J.; Barrow, C.J. y Puri, M. 2016. "Understanding physicochemical changes in pretreated and enzyme hydrolysed hemp (*Cannabis sativa*) biomass for biorefinery development". *Biomass Conversion and Biorefinery*, **6**(2), 127-138.

Adel, A.M.; El-Wahab, Z.H.A.; Ibrahim, A.A. y Al-Shemy, M.T. 2010. "Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part I. Acid catalyzed hydrolysis". *Bioresource Technology*, **101**(12), 4446-4455.

Agilent, 2015: "An introduction to gel permeation chromatography and size exclusion chromatography". 5990-6969EN. Agilent Technologies, Inc. 2015. Disponible en: <http://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5990-6969EN%20GPC%20SEC%20Chrom%20Guide.pdf> (Último acceso: 29/11/2016).

Alonso, M.V.; Oliet, M.; Rodríguez, F.; García, J.; Gilarranz, M. y Rodríguez, J. 2005. "Modification of ammonium lignosulfonate by phenolation for use in phenolic resins". *Bioresource Technology*, **96**(9), 1013-1018.

Amiri, H. y Karimi, K. 2015. "Autohydrolysis: A promising pretreatment for the improvement of acetone, butanol, and ethanol production from woody materials". *Chemical Engineering Science*, **137**, 722-729.

ASPAPEL, 2016: Memoria de sostenibilidad 2015. Asociación Española de Fabricantes de Pasta, Papel y Cartón. Madrid. Disponible en: http://www.aspapel.es/sites/default/files/publicaciones/doc_364.pdf (Último acceso: 29/11/2016).

Avci, A.; Saha, B.C.; Dien, B.S.; Kennedy, G.J. y Cotta, M.A. 2013. "Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production". *Bioresource Technology*, **130**, 603-612.

Bacovsky, D.; Ludwiczek, N.; Ognissanto, M. y Wörgetter, M. 2013. "Status of advanced biofuels demonstration facilities in 2012". *A report to IEA Bioenergy Task 39*.

Baker, D.A. y Rials, T.G. 2013. "Recent advances in low-cost carbon fiber manufacture from lignin". *Journal of Applied Polymer Science*, **130**(2), 713-728.

Barneto, A.G.; Carmona, J.A.; Alfonso, J.E.M. y Alcaide, L.J. 2009. "Use of autocatalytic kinetics to obtain composition of lignocellulosic materials". *Bioresource Technology*, **100**(17), 3963-3973.

Batalha, L.A.R.; Han, Q.; Jameel, H.; Chang, H.-m.; Colodette, J.L. y Gomes, F.J.B. 2015. "Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining". *Bioresource Technology*, **180**, 97-105.

Behera, S.; Arora, R.; Nandhagopal, N. y Kumar, S. 2014. "Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **36**, 91-106.

Betarenewables, 2016: Información sobre el proyecto Crescentino. Betarenewables. Disponible en: <http://www.betarenewables.com/en/crescentino/the-project> (Último acceso: 29/11/2016).

Bhagia, S.; Kumar, R. y Wyman, C.E. 2017. "Effects of dilute acid and flowthrough pretreatments and BSA supplementation on enzymatic deconstruction of poplar by cellulase and xylanase". *Carbohydrate Polymers*, **157**, 1940-1948.

Biswas, A.K.; Umeki, K.; Yang, W. y Blasiak, W. 2011. "Change of pyrolysis characteristics and structure of woody biomass due to steam explosion pretreatment". *Fuel Processing Technology*, **92**(10), 1849-1854.

Box, G.E.; Hunter, J.S. y Hunter, W.G. 2011. *Estadística para investigadores: Diseño, innovación y descubrimiento*. 2ª Edición. Ed. Reverté.

Bozell, J.J. y Petersen, G.R. 2010. "Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates-the US Department of Energy's "Top 10" revisited". *Green Chemistry*, **12**(4), 539-554.

Brienzo, M.; Fikizolo, S.; Benjamin, Y.; Tyhoda, L. y Görgens, J. 2017. "Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples". *Renewable Energy*, **104**, 271-280.

- Brosse, N.; Sannigrahi, P. y Ragauskas, A. 2009. "Pretreatment of *Miscanthus x giganteus* using the ethanol organosolv process for ethanol production". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **48**(18), 8328-8334.
- Bruijnincx, P.C.A.; Rinaldi, R. y Weckhuysen, B.M. 2015. "Unlocking the potential of a sleeping giant: lignins as sustainable raw materials for renewable fuels, chemicals and materials". *Green Chemistry*, **17**(11), 4860-4861.
- Buruiana, C.-T.; Vizireanu, C.; Garrote, G. y Parajó, J.C. 2014. "Optimization of corn stover biorefinery for coproduction of oligomers and second generation bioethanol using non-isothermal autohydrolysis". *Industrial Crops and Products*, **54**, 32-39.
- Cabrera, M.N.; Arrosbide, M.F.; Franzoni, P. y Cassella, N. 2016. "Integrated forest biorefineries: green liquor extraction in eucalyptus wood prior to kraft pulping". *Biomass Conversion and Biorefinery*, **6**(4), 465-474.
- Cao, S.; Pu, Y.; Studer, M.; Wyman, C. y Ragauskas, A.J. 2012. "Chemical transformations of *Populus trichocarpa* during dilute acid pretreatment". *RSC Advances*, **2**(29), 10925-10936.
- Cara, C.; Ruiz, E.; Ballesteros, I.; Negro, M.J. y Castro, E. 2006. "Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification". *Process Biochemistry*, **41**(2), 423-429.
- Casas, A.; Oliet, M.; Alonso, M.V.; Santos, T.M. y Rodriguez, F. 2013. "Dissolution of *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* woods in 1-allyl-3-methylimidazolium chloride for cellulose or lignin regeneration". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **52**(10), 3628-3636.
- Cebreiros, F.; Ferrari, M.D. y Lareo, C. 2017. "Combined autohydrolysis and alkali pretreatments for cellulose enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus grandis* wood". *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-10.
- Chakar, F.S. y Ragauskas, A.J. 2004. "Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry". *Industrial Crops and Products*, **20**(2), 131-141.
- Chandra, R.P.; Bura, R.; Mabee, W.; Berlin, d.A.; Pan, X. y Saddler, J. 2007. Cap. 3 "Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?". En: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. N° 108 (Biofuels).
- Chandra, R.; Ewanick, S.; Hsieh, C. y Saddler, J.N. 2008. "The characterization of pretreated lignocellulosic substrates prior to enzymatic hydrolysis, Part 1: a modified Simons' staining technique". *Biotechnology Progress*, **24**(5), 1178-1185.
- Chaturvedi, V. y Verma, P. 2013. "An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products". *3 Biotech*, **3**(5), 415-431.
- Chen, H.; Han, Y. y Xu, J. 2008. "Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide". *Process Biochemistry*, **43**(12), 1462-1466.

-
- Chen, W.-H. y Kuo, P.-C. 2010. "A study on torrefaction of various biomass materials and its impact on lignocellulosic structure simulated by a thermogravimetry". *Energy*, **35**(6), 2580-2586.
- Chen, W.H.; Tu, Y.J. y Sheen, H.K. 2010. "Impact of dilute acid pretreatment on the structure of bagasse for bioethanol production". *International Journal of Energy Research*, **34**(3), 265-274.
- Chen, W.-H.; Pen, B.-L.; Yu, C.-T. y Hwang, W.-S. 2011a. "Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production". *Bioresource Technology*, **102**(3), 2916-2924.
- Chen, X.; Yu, J.; Zhang, Z. y Lu, C. 2011b. "Study on structure and thermal stability properties of cellulose fibers from rice straw". *Carbohydrate Polymers*, **85**(1), 245-250.
- Chen, M.-H.; Dien, B.S.; Vincent, M.L.; Below, F.E. y Singh, V. 2014. "Effect of harvest maturity on carbohydrates for ethanol production from sugar enhanced temperate x tropical maize hybrid". *Industrial Crops and Products*, **60**, 266-272.
- Chen, H.; Zhao, J.; Hu, T.; Zhao, X. y Liu, D. 2015. "A comparison of several organosolv pretreatments for improving the enzymatic hydrolysis of wheat straw: Substrate digestibility, fermentability and structural features". *Applied Energy*, **150**, 224-232.
- Chen, X.; Li, H.; Sun, S.; Cao, X. y Sun, R. 2016. "Effect of hydrothermal pretreatment on the structural changes of alkaline ethanol lignin from wheat straw". *Scientific Reports*, **6**:39354.
- Cheng, K.; Winter, W.T. y Stipanovic, A.J. 2012. "A modulated-TGA approach to the kinetics of lignocellulosic biomass pyrolysis/combustion". *Polymer Degradation and Stability*, **97**(9), 1606-1615.
- Cheng, S.; Yuan, Z.; Leitch, M.; Anderson, M. y Xu, C.C. 2013. "Highly efficient de-polymerization of organosolv lignin using a catalytic hydrothermal process and production of phenolic resins/adhesives with the depolymerized lignin as a substitute for phenol at a high substitution ratio". *Industrial Crops and Products*, **44**, 315-322.
- Cherubini, F.; Jungmeier, G.; Wellisch, M.; Willke, T.; Skiadas, I.; Van Ree, R. y de Jong, E. 2009. "Toward a common classification approach for biorefinery systems". *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **3**(5), 534-546.
- Colom, X.; Carrillo, F.; Nogués, F. y Garriga, P. 2003. "Structural analysis of photodegraded wood by means of FTIR spectroscopy". *Polymer Degradation and Stability*, **80**(3), 543-549.
- Conde, E.; Fang, W.; Hemming, J.; Willför, S.; Moure, A.; Domínguez, H. y Parajó, J.C. 2013. "Water-soluble components of *Pinus pinaster* wood". *BioResources*, **8**(2), 2047-2063.
- Constant, S.; Basset, C.; Dumas, C.; Di Renzo, F.; Robitzer, M.; Barakat, A. y Quignard, F. 2015. "Reactive organosolv lignin extraction from wheat straw: Influence of Lewis acid catalysts on structural and chemical properties of lignins". *Industrial Crops and Products*, **65**, 180-189.

- Cuevas, M.; García, J.F. y Sánchez, S. 2014. "Enhanced enzymatic hydrolysis of pretreated almond-tree prunings for sugar production". *Carbohydrate Polymers*, **99**, 791-799.
- Cui, X.; Zhao, X.; Zeng, J.; Loh, S.K.; Choo, Y.M. y Liu, D. 2014. "Robust enzymatic hydrolysis of formiline-pretreated oil palm empty fruit bunches (EFB) for efficient conversion of polysaccharide to sugars and ethanol". *Bioresource Technology*, **166**, 584-591.
- Cybulska, I.; Brudecki, G.P.; Zembrzuska, J.; Schmidt, J.E.; Lopez, C.G.-B. y Thomsen, M.H. 2017. "Organosolv delignification of agricultural residues (date palm fronds, *Phoenix dactylifera* L.) of the United Arab Emirates". *Applied Energy*, **185**, Part 2, 1040-1050.
- da Costa Lopes, A.M.; João, K.G.; Morais, A.R.C.; Bogel-Lukasik, E. y Bogel-Lukasik, R. 2013. "Ionic liquids as a tool for lignocellulosic biomass fractionation". *Sustainable Chemical Processes*, **1**(1), 3.
- Dagnino, E.; Chamorro, E.; Romano, S.; Felissia, F. y Area, M. 2013. "Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production". *Industrial Crops and Products*, **42**, 363-368.
- de Jong, E. y Jungmeier, G. 2015. Cap. 1 "Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries". En: *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Ed. Elsevier.
- de Wild, P.; Huijgen, W.; van der Linden, R. y den Uil, H. 2015. Organosolv fractionation of lignocellulosic biomass for an integrated biorefinery, ECN-V--14-010.
- Del Rio, L.; Chandra, R. y Saddler, J. 2010. "The effect of varying organosolv pretreatment chemicals on the physicochemical properties and cellulolytic hydrolysis of mountain pine beetle-killed lodgepole pine". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **161**(1-8), 1-21.
- Ding, R.; Wu, H.; Thunga, M.; Bowler, N. y Kessler, M.R. 2016. "Processing and characterization of low-cost electrospun carbon fibers from organosolv lignin/polyacrylonitrile blends". *Carbon*, **100**, 126-136.
- DIRECTIVA (UE) 2015/1513: Directiva (UE) 2015/1513 del Parlamento Europeo y del Consejo de 9 de septiembre de 2015 por la que se modifican la Directiva 98/70/CE, relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo, y la Directiva 2009/28/CE, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables, Diario Oficial de la Unión Europea. 15 Septiembre 2011.
- Doherty, W.O.; Mousavioun, P. y Fellows, C.M. 2011. "Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers". *Industrial Crops and Products*, **33**(2), 259-276.
- Domínguez, J.C.; Oliet, M.; Alonso, M.V.; Gilarranz, M.A. y Rodríguez, F. 2008. "Thermal stability and pyrolysis kinetics of organosolv lignins obtained from *Eucalyptus globulus*". *Industrial Crops and Products*, **27**(2), 150-156.

Dong, S.; Bortner, M.J. y Roman, M. 2016. "Analysis of the sulfuric acid hydrolysis of wood pulp for cellulose nanocrystal production: A central composite design study". *Industrial Crops and Products*, **93**, 76-87.

EBTP, 2016: "Borregaard-commercial plant in Sarpsborg, Norway". Biofuel Fact Sheet. European Biofuels Technology Platform (EBTP). Disponible en: biofuelstp.eu/factsheets/Factsheet_Borregaard_final.pdf (Último acceso: 29/11/2016).

El Hage, R.; Brosse, N.; Chrusciel, L.; Sanchez, C.; Sannigrahi, P. y Ragauskas, A. 2009. "Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from *Miscanthus*". *Polymer Degradation and Stability*, **94**(10), 1632-1638.

El Hage, R.; Chrusciel, L.; Desharnais, L. y Brosse, N. 2010. "Effect of autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* on lignin structure and organosolv delignification". *Bioresource Technology*, **101**(23), 9321-9329.

Erdocia, X.; Prado, R.; Corcuera, M.Á. y Labidi, J. 2014. "Effect of different organosolv treatments on the structure and properties of olive tree pruning lignin". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **20**(3), 1103-1108.

Eriksson, T.; Börjesson, J. y Tjerneld, F. 2002. "Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose". *Enzyme and Microbial Technology*, **31**(3), 353-364.

Ertas, M.; Han, Q.; Jameel, H. y Chang, H.-m. 2014. "Enzymatic hydrolysis of autohydrolyzed wheat straw followed by refining to produce fermentable sugars". *Bioresource Technology*, **152**, 259-266.

Espinoza-Acosta, J.L.; Torres-Chávez, P.I.; Ramírez-Wong, B.; López-Saiz, C.M. y Montañón-Leyva, B. 2016. "Antioxidant, antimicrobial, and antimutagenic properties of technical lignins and their applications". *BioResources*, **11**(2), 5452-5481.

European Bioplastic, 2016: Datos del mercado de los bioplásticos. European-Bioplastic. Disponible en: <http://www.european-bioplastics.org/market/> (Último acceso: 29/11/2016).

FAO, 2016: "Wood Energy". Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: <http://www.fao.org/forestry/energy/en/> (Último acceso: 03/07/2016).

Fernández, A. y Sarmiento, A. 2004. "El pino radiata (*Pinus radiata*). Manual de gestión forestal sostenible". *Castilla y León, España: Junta de Castilla y León*.

Ferrer, A.; Requejo, A.; Rodríguez, A. y Jiménez, L. 2013. "Influence of temperature, time, liquid/solid ratio and sulfuric acid concentration on the hydrolysis of palm empty fruit bunches". *Bioresource Technology*, **129**, 506-511.

Galbe, M. y Zacchi, G. 2007. Cap. 2 "Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production". En: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. N° 108 (Biofuels).

- García, M. 2009. *Biorrefinerías: Situación Actual y Perspectivas de Futuro*. Ed. Informe de Vigilancia Tecnológica. Madrid (España): Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica. Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.
- Gašparovič, L.; Koreňová, Z. y Jelemenský, L. 2010. "Kinetic study of wood chips decomposition by TGA". *Chemical Papers*, **64**(2), 174-181.
- Ghose, M.K. 2011. Cap. 3 "Production of fuels from wood sources". En: *The Biofuels Handbook*. Ed. The Royal Society of Chemistry. RSC Energy Series N° 5.
- Gírio, F.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.; Marques, S. y Bogel-Lukasik, R. 2010. "Hemicelluloses for fuel ethanol: a review". *Bioresource Technology*, **101**(13), 4775-4800.
- Gonçalves, F.A.; Ruiz, H.A.; dos Santos, E.S.; Teixeira, J.A. y de Macedo, G.R. 2015. "Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis". *Industrial Crops and Products*, **77**, 1-12.
- González-Muñoz, M.; Alvarez, R.; Santos, V. y Parajó, J. 2012. "Production of hemicellulosic sugars from *Pinus pinaster* wood by sequential steps of aqueous extraction and acid hydrolysis". *Wood Science and Technology*, **46**(1-3), 271-285.
- Gordobil, O.; Egüés, I. y Labidi, J. 2016. "Modification of Eucalyptus and Spruce organosolv lignins with fatty acids to use as filler in PLA". *Reactive and Functional Polymers*, **104**, 45-52.
- Goshadrou, A.; Karimi, K. y Lefsrud, M. 2013. "Characterization of ionic liquid pretreated aspen wood using semi-quantitative methods for ethanol production". *Carbohydrate Polymers*, **96**(2), 440-449.
- Govumoni, S.P.; Koti, S.; Kothagouni, S.Y.; Venkateshwar, S. y Linga, V.R. 2013. "Evaluation of pretreatment methods for enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production". *Carbohydrate Polymers*, **91**(2), 646-650.
- Guo, Y.; Zhou, J.; Wen, J.; Sun, G. y Sun, Y. 2015. "Structural transformations of triploid of *Populus tomentosa* Carr. lignin during auto-catalyzed ethanol organosolv pretreatment". *Industrial Crops and Products*, **76**, 522-529.
- Gutiérrez-Rojas, I.; Moreno-Sarmiento, N. y Montoya, D. 2015. "Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos". *Revista Iberoamericana de Micología*, **32**(1), 1-12.
- Gütsch, J.S.; Nousiainen, T. y Sixta, H. 2012. "Comparative evaluation of autohydrolysis and acid-catalyzed hydrolysis of *Eucalyptus globulus* wood". *Bioresource Technology*, **109**, 77-85.
- Hallac, B.B.; Sannigrahi, P.; Pu, Y.; Ray, M.; Murphy, R.J. y Ragauskas, A.J. 2010a. "Effect of ethanol organosolv pretreatment on enzymatic hydrolysis of *Buddleja davidii* stem biomass". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **49**(4), 1467-1472.

Hallac, B.B.; Pu, Y. y Ragauskas, A.J. 2010b. "Chemical transformations of *Buddleja davidii* lignin during ethanol organosolv pretreatment". *Energy and Fuels*, **24**(4), 2723-2732.

Henriksson, G.; Li, J.; Zhang, L. y Lindstrom, M.E. 2010. Cap. 9 "Lignin utilization". En: *Thermochemical conversion of biomass to liquid fuels and chemicals*. Ed. The Royal Society of Chemistry. RSC Energy and Environment Series N° 1.

Hideno, A.; Kawashima, A.; Endo, T.; Honda, K. y Morita, M. 2013. "Ethanol-based organosolv treatment with trace hydrochloric acid improves the enzymatic digestibility of Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*) by exposing nanofibers on the surface". *Bioresource Technology*, **132**, 64-70.

Hosseinaei, O.; Harper, D.P.; Bozell, J.J. y Rials, T.G. 2016. "Role of physicochemical structure of organosolv hardwood and herbaceous lignins on carbon fiber performance". *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, **4**(10), 5785-5798.

Hou, Q.; Wang, Y.; Liu, W.; Liu, L.; Xu, N. y Li, Y. 2014. "An application study of autohydrolysis pretreatment prior to poplar chemi-thermomechanical pulping". *Bioresource Technology*, **169**, 155-161.

Huijgen, W.J.J.; Reith, J.H. y den Uil, H. 2010. "Pretreatment and fractionation of wheat straw by an acetone-based organosolv process". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **49**(20), 10132-10140.

Huijgen, W.J.J.; Smit, A.T.; Reith, J.H. y den Uil, H. 2011. "Catalytic organosolv fractionation of willow wood and wheat straw as pretreatment for enzymatic cellulose hydrolysis". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **86**(11), 1428-1438.

Huijgen, W.J.J.; Smit, A.T.; de Wild, P.J. y den Uil, H. 2012. "Fractionation of wheat straw by prehydrolysis, organosolv delignification and enzymatic hydrolysis for production of sugars and lignin". *Bioresource Technology*, **114**, 389-398.

Huijgen, W.J.J.; Telysheva, G.; Arshanitsa, A.; Gosselink, R.J.A. y de Wild, P.J. 2014. "Characteristics of wheat straw lignins from ethanol-based organosolv treatment". *Industrial Crops and Products*, **59**, 85-95.

Hussin, M.H.; Rahim, A.A.; Ibrahim, M.N.M. y Brosse, N. 2013. "Physicochemical characterization of alkaline and ethanol organosolv lignins from oil palm (*Elaeis guineensis*) fronds as phenol substitutes for green material applications". *Industrial Crops and Products*, **49**, 23-32.

Hussin, M.H.; Rahim, A.A.; Mohamad Ibrahim, M.N.; Yemloul, M.; Perrin, D. y Brosse, N. 2014. "Investigation on the structure and antioxidant properties of modified lignin obtained by different combinative processes of oil palm fronds (OPF) biomass". *Industrial Crops and Products*, **52**, 544-551.

Ioelovich, M. 2015. "Recent findings and the energetic potential of plant biomass as a renewable source of biofuels—a review". *BioResources*, **10**(1), 1879-1914.

- Ishola, M.M. y Taherzadeh, M.J. 2014. "Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB)". *Bioresource Technology*, **165**, 9-12.
- Isikgor, F.H. y Becer, C.R. 2015. "Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers". *Polymer Chemistry*, **6**(25), 4497-4559.
- Jang, S.-K.; Kim, H.-Y.; Jeong, H.-S.; Kim, J.-Y.; Yeo, H. y Choi, I.-G. 2016. "Effect of ethanol organosolv pretreatment factors on enzymatic digestibility and ethanol organosolv lignin structure from *Liriodendron tulipifera* in specific combined severity factors". *Renewable Energy*, **87**, 599-606.
- Jiménez, M.G. 2015. "Superficies de respuesta mediante un diseño central compuesto". *Revista Varianza*, **11**, 31-36.
- Jönsson, L.J. y Martín, C. 2016. "Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects". *Bioresource Technology*, **199**, 103-112.
- Jungmeier, G.; Van Ree, R.; de Jong, E.; Stichnothe, H.; de Bari, I.; Jørgensen, H.; Wellisch, M.; Bell, G.; Spaeth, J.; Torr, K. y Kimura, S. 2015. "Assessing biorefineries using wood for the bioeconomy - Current status and future perspective of IEA Bioenergy Task 42 - Biorefining". *18th ISWFPC (International Symposium on Wood, Fiber and Pulp Chemistry)*, 9-11 Septiembre, Viena, Austria. pp. 157-160.
- Kamm, B. y Kamm, M. 2004. "Principles of biorefineries". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**(2), 137-145.
- Karimi, K. y Taherzadeh, M.J. 2016a. "A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity". *Bioresource Technology*, **200**, 1008-1018.
- Karimi, K. y Taherzadeh, M.J. 2016b. "A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility". *Bioresource Technology*, **203**, 348-356.
- Keey, R.B. 2005. "Colour development on drying". *Maderas. Ciencia y tecnología*, **7**(1), 3-16.
- Kilpeläinen, I.; Xie, H.; King, A.; Granstrom, M.; Heikkinen, S. y Argyropoulos, D.S. 2007. "Dissolution of wood in ionic liquids". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(22), 9142-9148.
- Kim, D.-E. y Pan, X. 2010. "Preliminary study on converting hybrid poplar to high-value chemicals and lignin using organosolv ethanol process". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **49**(23), 12156-12163.
- Kim, I. y Han, J.-I. 2012. "Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology". *Biomass and Bioenergy*, **46**, 210-217.

Kim, J.-Y.; Oh, S.; Hwang, H.; Kim, U.-J. y Choi, J.W. 2013. "Structural features and thermal degradation properties of various lignin macromolecules obtained from poplar wood (*Populus albaglandulosa*)". *Polymer Degradation and Stability*, **98**(9), 1671-1678.

Kim, H.-Y.; Jeong, H.-S.; Lee, S.-Y.; Choi, J.W. y Choi, I.-G. 2015. "Pd-catalyst assisted organosolv pretreatment to isolate ethanol organosolv lignin retaining compatible characteristics for producing phenolic monomer". *Fuel*, **153**, 40-47.

Ko, J.K.; Kim, Y.; Ximenes, E. y Ladisch, M.R. 2015. "Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose". *Biotechnology and Bioengineering*, **112**(2), 252-262.

Koo, B.-W.; Park, N.; Jeong, H.-S.; Choi, J.-W.; Yeo, H. y Choi, I.-G. 2011. "Characterization of by-products from organosolv pretreatments of yellow poplar wood (*Liriodendron tulipifera*) in the presence of acid and alkali catalysts". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **17**(1), 18-24.

Koo, B.-W.; Min, B.-C.; Gwak, K.-S.; Lee, S.-M.; Choi, J.-W.; Yeo, H. y Choi, I.-G. 2012. "Structural changes in lignin during organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and the effect on enzymatic hydrolysis". *Biomass and Bioenergy*, **42**, 24-32.

Krogell, J.; Korotkova, E.; Eränen, K.; Pranovich, A.; Salmi, T.; Murzin, D. y Willför, S. 2013. "Intensification of hemicellulose hot-water extraction from spruce wood in a batch extractor – Effects of wood particle size". *Bioresource Technology*, **143**, 212-220.

Kumar, P.; Barrett, D.M.; Delwiche, M.J. y Stroeve, P. 2009. "Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **48**(8), 3713-3729.

Lai, C.; Tu, M.; Li, M. y Yu, S. 2014. "Remarkable solvent and extractable lignin effects on enzymatic digestibility of organosolv pretreated hardwood". *Bioresource Technology*, **156**, 92-99.

Laure, S.; Leschinsky, M.; Fröhling, M.; Schultmann, F. y Unkelbach, G. 2014. "Assessment of an Organosolv lignocellulose biorefinery concept based on a material flow analysis of a pilot plant". *Cellulose Chemistry and Technology*, **48**, 793-798.

Lavoine, N.; Desloges, I.; Dufresne, A. y Bras, J. 2012. "Microfibrillated cellulose-Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review". *Carbohydrate Polymers*, **90**(2), 735-764.

Lee, S.H.; Doherty, T.V.; Linhardt, R.J. y Dordick, J.S. 2009a. "Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis". *Biotechnology and Bioengineering*, **102**(5), 1368-1376.

Lee, J.M.; Shi, J.; Venditti, R.A. y Jameel, H. 2009b. "Autohydrolysis pretreatment of Coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis". *Bioresource Technology*, **100**(24), 6434-6441.

Lee, J.W.; Kim, J.Y.; Jang, H.M.; Lee, M.W. y Park, J.M. 2015. "Sequential dilute acid and alkali pretreatment of corn stover: sugar recovery efficiency and structural characterization". *Bioresource Technology*, **182**, 296-301.

- Li, J.; Henriksson, G. y Gellerstedt, G. 2007. "Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion". *Bioresource Technology*, **98**(16), 3061-3068.
- Li, J. y Gellerstedt, G. 2008. "Improved lignin properties and reactivity by modifications in the autohydrolysis process of aspen wood". *Industrial Crops and Products*, **27**(2), 175-181.
- Li, Y. y Ragauskas, A.J. 2012. "Ethanol organosolv lignin-based rigid polyurethane foam reinforced with cellulose nanowhiskers". *RSC Advances*, **2**(8), 3347-3351.
- Li, Z.; Jiang, Z.; Fei, B.; Pan, X.; Cai, Z. y Yu, Y. 2012. "Ethanol organosolv pretreatment of bamboo for efficient enzymatic saccharification". *BioResources*, **7**(3), 3452-3462.
- Li, M.-F.; Chen, C.-Z. y Sun, R.-C. 2014a. "Effect of pretreatment severity on the enzymatic hydrolysis of bamboo in hydrothermal deconstruction". *Cellulose*, **21**(6), 4105-4117.
- Li, H.; Pu, Y.; Kumar, R.; Ragauskas, A.J. y Wyman, C.E. 2014b. "Investigation of lignin deposition on cellulose during hydrothermal pretreatment, its effect on cellulose hydrolysis, and underlying mechanisms". *Biotechnology and Bioengineering*, **111**(3), 485-492.
- Li, M.-F.; Yang, S. y Sun, R.-C. 2016. "Recent advances in alcohol and organic acid fractionation of lignocellulosic biomass". *Bioresource Technology*, **200**, 971-980.
- Liu, Q.; Wang, S.; Zheng, Y.; Luo, Z. y Cen, K. 2008. "Mechanism study of wood lignin pyrolysis by using TG-FTIR analysis". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **82**(1), 170-177.
- Liu, Z.-H.; Qin, L.; Zhu, J.-Q.; Li, B.-Z. y Yuan, Y.-J. 2014. "Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature". *Biotechnology for Biofuels*, **7**(1), 1.
- Llorente, M. y Horta, A. 1991. *Técnicas de caracterización de polímeros*. Ed. UNED, Madrid.
- Loaiza, J.; López, F.; García, M.; Fernández, O.; Díaz, M. y García, J. 2016. "Selecting the pre-hydrolysis conditions for Eucalyptus wood in a fractional exploitation biorefining scheme". *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **36**(3), 211-223.
- Luo, X. y Zhu, J. 2011. "Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses". *Enzyme and Microbial Technology*, **48**(1), 92-99.
- Magrama, 2016: "Los pinares de *Pinus radiata*". Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/desarrollo-rural/temas/politica-forestal/pradiata_tcm7-386705.pdf (Último acceso: 07/06/2016).
- Mahmood, N.; Yuan, Z.; Schmidt, J. y Xu, C. 2016. "Depolymerization of lignins and their applications for the preparation of polyols and rigid polyurethane foams: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **60**, 317-329.

-
- Martín-Sampedro, R.; Eugenio, M.E.; Revilla, E.; Martín, J.A. y Villar, J.C. 2011. "Integration of kraft pulping on a forest biorefinery by the addition of a steam explosion pretreatment". *BioResources*, **6**(1), 513-528.
- Martín-Sampedro, R.; Eugenio, M.E.; García, J.C.; Lopez, F.; Villar, J.C. y Díaz, M.J. 2012. "Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*". *Biomass and Bioenergy*, **42**, 97-106.
- Marzioletti, T.; Valenzuela Olarte, M.B.; Sievers, C.; Hoskins, T.J.C.; Agrawal, P.K. y Jones, C.W. 2008. "Dilute acid hydrolysis of Loblolly pine: A comprehensive approach". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **47**(19), 7131-7140.
- McDonough, T.J. 1992. "The chemistry of organosolv delignification". Institute for Paper Science and Technology. IPST Technical Paper Series Number 455.
- Meng, X. y Ragauskas, A.J. 2014. "Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates". *Current Opinion in Biotechnology*, **27**, 150-158.
- Meng, X.; Wells, T.; Sun, Q.; Huang, F. y Ragauskas, A. 2015. "Insights into the effect of dilute acid, hot water or alkaline pretreatment on the cellulose accessible surface area and the overall porosity of *Populus*". *Green Chemistry*, **17**(8), 4239-4246.
- Mesa, L.; González, E.; Cara, C.; Ruiz, E.; Castro, E. y Mussatto, S.I. 2010. "An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **85**(8), 1092-1098.
- Mesa, L.; González, E.; Romero, I.; Ruiz, E.; Cara, C. y Castro, E. 2011. "Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse". *Chemical Engineering Journal*, **175**, 185-191.
- Michelin, M. y Teixeira, J.A. 2016. "Liquid hot water pretreatment of multi feedstocks and enzymatic hydrolysis of solids obtained thereof". *Bioresource Technology*, **216**, 862-869.
- Mohan, D.; Pittman, C.U. y Steele, P.H. 2006. "Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review". *Energy and Fuels*, **20**(3), 848-889.
- Moniz, P.; Pereira, H.; Quilhó, T. y Carvalheiro, F. 2013. "Characterisation and hydrothermal processing of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses". *Industrial Crops and Products*, **50**, 145-153.
- Moniz, P.; João, L.; Duarte, L.C.; Roseiro, L.B.; Boeriu, C.G.; Pereira, H. y Carvalheiro, F. 2015. "Fractionation of hemicelluloses and lignin from rice straw by combining autohydrolysis and optimised mild organosolv delignification". *BioResources*, **10**(2), 2626-2641.
- Montgomery, D.C. 2012. *Design and analysis of experiments*, 8ª Edición. Ed. John Wiley & Sons, Incorporated.

- Moreno, A.D.; Ibarra, D.; Alvira, P.; Tomás-Pejó, E. y Ballesteros, M. 2015. "A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production". *Critical Reviews in Biotechnology*, **35**, 342-352.
- Nishiyama, Y.; Kim, U.-J.; Kim, D.-Y.; Katsumata, K.S.; May, R.P. y Langan, P. 2003. "Periodic disorder along ramie cellulose microfibrils". *Biomacromolecules*, **4**(4), 1013-1017.
- Noori, M.S. y Karimi, K. 2016. "Detailed study of efficient ethanol production from elmwood by alkali pretreatment". *Biochemical Engineering Journal*, **105**, 197-204.
- Noparat, P.; Prasertsan, P.; Sompong, O. y Pan, X. 2015. "Dilute acid pretreatment of oil palm trunk biomass at high temperature for enzymatic hydrolysis". *Energy Procedia*, **79**, 924-929.
- NREL/TP-5100-63351: Resch, M.; Baker, J. y Decker, S. 2015. "Low solids enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass".
- NREL/TP-510-42618: Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. y Crocker, D. 2008. "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass".
- NREL/TP-510-42621: Sluiter, A.; Hames, B.; Hyman, D.; Payne, C.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. y Wolfe, J. 2008. "Biomass and total dissolved solids in liquid process samples".
- NREL: Definición biorrefinería. <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html> (Último acceso: 20/05/2016).
- Obama, P.; Ricochon, G.; Muniglia, L. y Brosse, N. 2012. "Combination of enzymatic hydrolysis and ethanol organosolv pretreatments: Effect on lignin structures, delignification yields and cellulose-to-glucose conversion". *Bioresource Technology*, **112**, 156-163.
- Ojeda, K.; Ávila, O.; Suárez, J. y Kafarov, V. 2011. "Evaluation of technological alternatives for process integration of sugarcane bagasse for sustainable biofuels production—Part 1". *Chemical Engineering Research and Design*, **89**(3), 270-279.
- Oliet, M.; García, J.; Rodríguez, F. y Gilarranz, M. 2002. "Solvent effects in autocatalyzed alcohol-water pulping: comparative study between ethanol and methanol as delignifying agents". *Chemical Engineering Journal*, **87**(2), 157-162.
- Oroumei, A.; Fox, B. y Naebe, M. 2015. "Thermal and rheological characteristics of biobased carbon fiber precursor derived from low molecular weight organosolv lignin". *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, **3**(4), 758-769.
- Pan, X.; Gilkes, N.; Kadla, J.; Pye, K.; Saka, S.; Gregg, D.; Ehara, K.; Xie, D.; Lam, D. y Saddler, J. 2006a. "Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: Optimization of process yields". *Biotechnology and Bioengineering*, **94**(5), 851-861.

Pan, X.; Kadla, J.F.; Ehara, K.; Gilkes, N. y Saddler, J.N. 2006b. "Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: Relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(16), 5806-5813.

Pan, X.; Xie, D.; Yu, R.W.; Lam, D. y Saddler, J.N. 2007. "Pretreatment of lodgepole pine killed by mountain pine beetle using the ethanol organosolv process: Fractionation and process optimization". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **46**(8), 2609-2617.

Pan, X. y Saddler, J.N. 2013. "Effect of replacing polyol by organosolv and kraft lignin on the property and structure of rigid polyurethane foam". *Biotechnology for Biofuels*, **6**(1), 1.

Panagiotopoulos, I.A.; Chandra, R.P. y Saddler, J.N. 2013. "A two-stage pretreatment approach to maximise sugar yield and enhance reactive lignin recovery from poplar wood chips". *Bioresource Technology*, **130**, 570-577.

Pandey, K.K. 1999. "A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy". *Journal of Applied Polymer Science*, **71**(12), 1969-1975.

Park, N.; Kim, H.-Y.; Koo, B.-W.; Yeo, H. y Choi, I.-G. 2010. "Organosolv pretreatment with various catalysts for enhancing enzymatic hydrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*)". *Bioresource Technology*, **101**(18), 7046-7053.

Park, J.; Meng, J.; Lim, K.H.; Rojas, O.J. y Park, S. 2013. "Transformation of lignocellulosic biomass during torrefaction". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **100**, 199-206.

Peng, F.; Peng, P.; Xu, F. y Sun, R.-C. 2012. "Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses". *Biotechnology Advances*, **30**(4), 879-903.

PER, 2011: "Resumen del Plan de Energías Renovables 2011-2020". Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDEA). 2011. Disponible en: http://www.minetad.gob.es/energia/es-ES/Novedades/Documents/Resumen_PER_2011-2020.pdf (Último acceso: 29/11/2016).

Perez-Pimienta, J.A.; Lopez-Ortega, M.G.; Varanasi, P.; Stavila, V.; Cheng, G.; Singh, S. y Simmons, B.A. 2013. "Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass". *Bioresource Technology*, **127**, 18-24.

Pielhop, T.; Larrazábal, G.O.; Studer, M.H.; Brethauer, S.; Seidel, C.-M. y von Rohr, P.R. 2015. "Lignin repolymerisation in spruce autohydrolysis pretreatment increases cellulase deactivation". *Green Chemistry*, **17**(6), 3521-3532.

Pielhop, T.; Amgarten, J.; Rohr, P.R. y Studer, M.H. 2016a. "Steam explosion pretreatment of softwood: the effect of the explosive decompression on enzymatic digestibility". *Biotechnology for Biofuels*, **9**(1), 152.

Pielhop, T.; Larrazábal, G.O. y von Rohr, P.R. 2016b. "Autohydrolysis pretreatment of softwood-enhancement by phenolic additives and the effects of other compounds". *Green Chemistry*, **18**(19), 5239-5247.

- Pihlajaniemi, V.; Sipponen, M.H.; Pastinen, O.; Lehtomäki, I. y Laakso, S. 2015. "Yield optimization and rational function modelling of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by NaOH-delignification, autohydrolysis and their combination". *Green Chemistry*, **17**(3), 1683-1691.
- Pihlajaniemi, V.; Sipponen, M.H.; Liimatainen, H.; Sirviö, J.A.; Nyssölä, A. y Laakso, S. 2016. "Weighing the factors behind enzymatic hydrolyzability of pretreated lignocellulose". *Green Chemistry*, **18**(5), 1295-1305.
- Pranovich, A.; Holmbom, B. y Willför, S. 2016. "Two-stage hot-water extraction of galactoglucomannans from spruce wood". *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **36**(2), 140-156.
- Pu, Y.; Treasure, T.; Gonzalez, R.; Venditti, R.A. y Jameel, H. 2013. "Autohydrolysis pretreatment of mixed softwood to produce value prior to combustion". *BioEnergy Research*, **6**(3), 1094-1103.
- Putro, J.N.; Soetaredjo, F.E.; Lin, S.-Y.; Ju, Y.-H. y Ismadji, S. 2016. "Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals". *RSC Advances*, **6**(52), 46834-46852.
- Qin, L.; Liu, Z.-H.; Jin, M.; Li, B.-Z. y Yuan, Y.-J. 2013. "High temperature aqueous ammonia pretreatment and post-washing enhance the high solids enzymatic hydrolysis of corn stover". *Bioresource Technology*, **146**, 504-511.
- Ratanakhanokchai, K.; Waeonukul, R.; Pason, P.; Aachaapaikoon, C.; Kyu, K.L.; Sakka, K.; Kosugi, A. y Mori, Y. 2013. Cap. 16 "Paenibacillus curdlanolyticus Strain B-6 multienzyme complex: A novel system for biomass utilization". En: *Biomass Now-Cultivation and Utilization*. Ed. InTech.
- Rivas, S.; González-Muñoz, M.J.; Santos, V. y Parajó, J.C. 2014. "Acidic processing of hemicellulosic saccharides from pine wood: product distribution and kinetic modeling". *Bioresource Technology*, **162**, 192-199.
- Rivas, S.; Raspolli-Galletti, A.M.; Antonetti, C.; Santos, V. y Parajó, J.C. 2016. "Sustainable conversion of *Pinus pinaster* wood into biofuel precursors: A biorefinery approach". *Fuel*, **164**, 51-58.
- Rollin, J.A.; Zhu, Z.; Sathitsuksanoh, N. y Zhang, Y.H.P. 2011. "Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: A comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia". *Biotechnology and Bioengineering*, **108**(1), 22-30.
- Romaní, A.; Garrote, G.; Alonso, J.L. y Parajó, J.C. 2010. "Experimental assessment on the enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated *Eucalyptus globulus* wood". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **49**(10), 4653-4663.
- Romaní, A.; Garrote, G.; López, F. y Parajó, J.C. 2011. "*Eucalyptus globulus* wood fractionation by autohydrolysis and organosolv delignification". *Bioresource Technology*, **102**(10), 5896-5904.

Romaní, A.; Ruiz, H.A.; Pereira, F.B.; Domingues, L. y Teixeira, J.A. 2013. "Fractionation of *Eucalyptus globulus* wood by glycerol-water pretreatment: Optimization and modeling". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **52**(40), 14342-14352.

Ruiz, H.A.; Ruzene, D.S.; Silva, D.P.; da Silva, F.F.M.; Vicente, A.A. y Teixeira, J.A. 2011. "Development and characterization of an environmentally friendly process sequence (autohydrolysis and organosolv) for wheat straw delignification". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **164**(5), 629-641.

Ruiz, H.A.; Vicente, A.A. y Teixeira, J.A. 2012. "Kinetic modeling of enzymatic saccharification using wheat straw pretreated under autohydrolysis and organosolv process". *Industrial Crops and Products*, **36**(1), 100-107.

Ruiz, H.A.; Rodriguez-Jasso, R.M.; Fernandes, B.D.; Vicente, A.A. y Teixeira, J.A. 2013. "Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **21**, 35-51.

Saha, B.C.; Iten, L.B.; Cotta, M.A. y Wu, Y.V. 2005. "Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol". *Process Biochemistry*, **40**(12), 3693-3700.

Saini, J.K.; Patel, A.K.; Adsul, M. y Singhania, R.R. 2016. "Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass". *Renewable Energy*, **98**, 29-42.

Sanchez, A.; Gil, J.C.; Rojas-Rejón, O.A.; de Alba, A.P.; Medina, A.; Flores, R. y Puente, R. 2015. "Sequential pretreatment strategies under mild conditions for efficient enzymatic hydrolysis of wheat straw". *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **38**(6), 1127-1141.

Sannigrahi, P.; Miller, S.J. y Ragauskas, A.J. 2010. "Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine". *Carbohydrate Research*, **345**(7), 965-970.

Sarkar, N.; Ghosh, S.K.; Bannerjee, S. y Aikat, K. 2012. "Bioethanol production from agricultural wastes: An overview". *Renewable Energy*, **37**(1), 19-27.

Scarlat, N.; Dallemand, J.-F.; Monforti-Ferrario, F. y Nita, V. 2015. "The role of biomass and bioenergy in a future bioeconomy: Policies and facts". *Environmental Development*, **15**, 3-34.

Schwanninger, M.; Rodrigues, J.C.; Pereira, H. y Hinterstoisser, B. 2004. "Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose". *Vibrational Spectroscopy*, **36**(1), 23-40.

Schwarze, F.W. 2007. "Wood decay under the microscope". *Fungal Biology Reviews*, **21**(4), 133-170.

Shamsudin, S.; Shah, U.K.M.; Zainudin, H.; Abd-Aziz, S.; Kamal, S.M.M.; Shirai, Y. y Hassan, M.A. 2012. "Effect of steam pretreatment on oil palm empty fruit bunch for the production of sugars". *Biomass and Bioenergy*, **36**, 280-288.

- Silva-Fernandes, T.; Duarte, L.C.; Carvalheiro, F.; Loureiro-Dias, M.C.; Fonseca, C. y Gírio, F. 2015. "Hydrothermal pretreatment of several lignocellulosic mixtures containing wheat straw and two hardwood residues available in Southern Europe". *Bioresource Technology*, **183**, 213-220.
- Singh, R.; Krishna, B.B.; Kumar, J. y Bhaskar, T. 2016. "Opportunities for utilization of non-conventional energy sources for biomass pretreatment". *Bioresource Technology*, **199**, 398-407.
- Sjöström, E. 1981. *Wood chemistry: fundamentals and applications*, 2ª Edición. Ed. Academic Press.
- Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. y Gómez, M.C.M. 2000. *Principios de análisis instrumental*, 5ª Edición. Ed. McGraw-Hill.
- Slopiecka, K.; Bartocci, P. y Fantozzi, F. 2012. "Thermogravimetric analysis and kinetic study of poplar wood pyrolysis". *Applied Energy*, **97**, 491-497.
- Snelders, J.; Dornez, E.; Benjelloun-Mlayah, B.; Huijgen, W.J.; de Wild, P.J. y Courtin, C.C.M. 2014a. "Comparison of CIMV and ECN organosolv processes". *Tomorrow's biorefineries in Europe*, 1-12 Febrero 2014, Bruselas, Bélgica.
- Snelders, J.; Dornez, E.; Benjelloun-Mlayah, B.; Huijgen, W.J.; de Wild, P.J.; Gosselink, R.J.; Gerritsma, J. y Courtin, C.M. 2014b. "Biorefining of wheat straw using an acetic and formic acid based organosolv fractionation process". *Bioresource Technology*, **156**, 275-282.
- Sun, N.; Rahman, M.; Qin, Y.; Maxim, M.L.; Rodríguez, H. y Rogers, R.D. 2009. "Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate". *Green Chemistry*, **11**(5), 646-655.
- Sun, S.; Cao, X.; Sun, S.; Xu, F.; Song, X.; Sun, R.-C. y Jones, G.L. 2014a. "Improving the enzymatic hydrolysis of thermo-mechanical fiber from *Eucalyptus urophylla* by a combination of hydrothermal pretreatment and alkali fractionation". *Biotechnology for Biofuels*, **7**(1), 1.
- Sun, S.-N.; Cao, X.-F.; Zhang, X.-M.; Xu, F.; Sun, R.-C. y Jones, G.L. 2014b. "Characteristics and enzymatic hydrolysis of cellulose-rich fractions from steam exploded and sequentially alkali delignified bamboo (*Phyllostachys pubescens*)". *Bioresource Technology*, **163**, 377-380.
- Sun, Q.; Foston, M.; Meng, X.; Sawada, D.; Pingali, S.V.; O'Neill, H.M.; Li, H.; Wyman, C.E.; Langan, P. y Ragauskas, A.J. 2014c. "Effect of lignin content on changes occurring in poplar cellulose ultrastructure during dilute acid pretreatment". *Biotechnology for Biofuels*, **7**(1), 1.
- Sun, T.-S.; Wang, K.; Yang, G.; Yang, H.-Y. y Xu, F. 2014d. "Hydrothermal treatment and enzymatic saccharification of corn cobs". *BioResources* **9**(2), 3000-3013.
- Sun, F.F.; Wang, L.; Hong, J.; Ren, J.; Du, F.; Hu, J.; Zhang, Z. y Zhou, B. 2015. "The impact of glycerol organosolv pretreatment on the chemistry and enzymatic hydrolyzability of wheat straw". *Bioresource Technology*, **187**, 354-361.

Sun, S.; Sun, S.; Cao, X. y Sun, R. 2016. "The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials". *Bioresource Technology*, **199**, 49-58.

Tachon, N.; Benjelloun-Mlayah, B. y Delmas, M. 2016. "Organosolv wheat straw lignin as a phenol substitute for green phenolic resins". *BioResources*, **11**(3), 5797-5815.

Talebnaia, F. 2015. Cap. 5 "Bioethanol from lignocellulosic wastes: Current status and future prospects". En: *Lignocellulose-based bioproducts*. Ed. Springer International Publishing Switzerland.

Tao, J.; Hosseinaei, O.; Delbeck, L.; Kim, P.; Harper, D.P.; Bozell, J.J.; Rials, T.G. y Labbe, N. 2016. "Effects of organosolv fractionation time on thermal and chemical properties of lignins". *RSC Advances*, **6**(82), 79228-79235.

Tejado, A.; Pena, C.; Labidi, J.; Echeverria, J.M. y Mondragon, I. 2007. "Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis". *Bioresource Technology*, **98**(8), 1655-1663.

Timilsena, Y.P.; Abeywickrama, C.J.; Rakshit, S.K. y Brosse, N. 2013. "Effect of different pretreatments on delignification pattern and enzymatic hydrolysability of miscanthus, oil palm biomass and typha grass". *Bioresource Technology*, **135**, 82-88.

Toledano, A.; Serrano, L. y Labidi, J. 2011. "Enhancement of lignin production from olive tree pruning integrated in a green biorefinery". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **50**(11), 6573-6579.

Tomás Pejó, E. 2010. "Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas de proceso". Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral.

Torr, K.M.; Love, K.T.; Simmons, B.A. y Hill, S.J. 2016. "Structural features affecting the enzymatic digestibility of pine wood pretreated with ionic liquids". *Biotechnology and Bioengineering*, **113**(3), 540-549.

Trache, D.; Hussin, M.H.; Chuin, C.T.H.; Sabar, S.; Fazita, M.N.; Taiwo, O.F.; Hassan, T. y Haafiz, M.M. 2016. "Microcrystalline cellulose: isolation, characterization and bio-composites application- A review". *International Journal of Biological Macromolecules*, **93**, 789-804.

Transgenomic, 2014: Columnas para el análisis de carbohidratos CARBOSep Transgenomic. Disponible en:
http://www.chromtech.com/products/hplc_columns/carbohydrate/transgenomic/transgenomic-brochure.pdf (Último acceso: 05/12/2016).

Vallejos, M.E.; Zambon, M.D.; Area, M.C. y da Silva Curvelo, A.A. 2015. "Low liquid-solid ratio fractionation of sugarcane bagasse by hot water autohydrolysis and organosolv delignification". *Industrial Crops and Products*, **65**, 349-353.

Van Dyk, J. y Pletschke, B. 2012. "A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – factors affecting enzymes, conversion and synergy". *Biotechnology Advances*, **30**(6), 1458-1480.

- Viell, J.; Harwardt, A.; Seiler, J. y Marquardt, W. 2013. "Is biomass fractionation by Organosolv-like processes economically viable? A conceptual design study". *Bioresource Technology*, **150**, 89-97.
- Vila, C.; Santos, V. y Parajó, J.C. 2014. "Manufacture of microcrystalline cellulose from Eucalyptus globulus wood using an environmentally friendly biorefinery method". *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **34**(1), 8-19.
- Wan, C. y Li, Y. 2011. "Effect of hot water extraction and liquid hot water pretreatment on the fungal degradation of biomass feedstocks". *Bioresource Technology*, **102**(20), 9788-9793.
- Wang, M.; Leitch, M. y Xu, C.C. 2009. "Synthesis of phenol-formaldehyde resol resins using organosolv pine lignins". *European Polymer Journal*, **45**(12), 3380-3388.
- Wang, K.; Bauer, S. y Sun, R.-c. 2011. "Structural transformation of *Miscanthus x giganteus* lignin fractionated under mild formosolv, basic organosolv, and cellulolytic enzyme conditions". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**(1), 144-152.
- Wang, W.; Yuan, T.; Wang, K.; Cui, B. y Dai, Y. 2012. "Combination of biological pretreatment with liquid hot water pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of *Populus tomentosa*". *Bioresource Technology*, **107**, 282-286.
- Wang, X.; Zhuang, J.; Jiang, J.; Fu, Y.; Qin, M. y Wang, Z. 2015a. "Separation and purification of hemicellulose-derived saccharides from wood hydrolysate by combined process". *Bioresource Technology*, **196**, 426-430.
- Wang, H.; Kobayashi, S. y Mochidzuki, K. 2015b. "Effect of non-enzymatic proteins on enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of different lignocellulosic materials". *Bioresource Technology*, **190**, 373-380.
- Wang, P.; Fu, Y.; Shao, Z.; Zhang, F. y Qin, M. 2016. "Structural changes to aspen wood lignin during autohydrolysis pretreatment". *BioResources*, **11**(2), 4086-4103.
- Wen, J.L.; Xue, B.L.; Sun, S.L. y Sun, R.C. 2013. "Quantitative structural characterization and thermal properties of birch lignins after auto-catalyzed organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **88**(9), 1663-1671.
- Werpy, T.; Petersen, G.; Aden, A.; Bozell, J.; Holladay, J.; White, J.; Manheim, A.; Eliot, D.; Lasure, L. y Jones, S. 2004. Top value added chemicals from biomass. Volume 1-Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. DTIC Document. (DOE/GO-102004-1992). Department of Energy Washington DC.
- Wiedenhoeft, A.C. 2010. Cap. 3 "Structure and function of wood". En: *Handbook of wood chemistry and wood composites*. Ed. General Technical Report FPLGTR-190. FPL, Madison, WI.
- Wiemann, M.C. 2010. Cap. 2 "Characteristics and availability of commercially important woods". En: *Wood Handbook – Wood as an Engineering Material*. Ed. General Technical Report FPLGTR-190. FPL, Madison, WI.

-
- Wildschut, J.; Smit, A.T.; Reith, J.H. y Huijgen, W.J. 2013. "Ethanol-based organosolv fractionation of wheat straw for the production of lignin and enzymatically digestible cellulose". *Bioresource Technology*, **135**, 58-66.
- Wiman, M.; Dienes, D.; Hansen, M.A.; van der Meulen, T.; Zacchi, G. y Lidén, G. 2012. "Cellulose accessibility determines the rate of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce". *Bioresource Technology*, **126**, 208-215.
- Windeisen, E. y Wegener, G. 2009. Cap. 9.4 "Wood". En: *Sustainable solutions for modern economies*. Ed. The Royal Society of Chemistry, Reino Unido.
- Xiao, L.-P.; Sun, Z.-J.; Shi, Z.-J.; Xu, F. y Sun, R.-C. 2011. "Impact of hot compressed water pretreatment on the structural changes of woody biomass for bioethanol production". *BioResources*, **6**(2), 1576-1598.
- Xiao, L.-P.; Shi, Z.-J.; Xu, F. y Sun, R.-C. 2013. "Hydrothermal treatment and enzymatic hydrolysis of *Tamarix ramosissima*: Evaluation of the process as a conversion method in a biorefinery concept". *Bioresource Technology*, **135**, 73-81.
- Yang, H.; Yan, R.; Chen, H.; Lee, D.H. y Zheng, C. 2007. "Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis". *Fuel*, **86**(12), 1781-1788.
- Yang, F.; Li, L.; Li, Q.; Tan, W.; Liu, W. y Xian, M. 2010. "Enhancement of enzymatic in situ saccharification of cellulose in aqueous-ionic liquid media by ultrasonic intensification". *Carbohydrate Polymers*, **81**(2), 311-316.
- Yang, H.; Wang, K.; Song, X.; Xu, F. y Sun, R.-C. 2012. "Enhanced enzymatic hydrolysis of triploid poplar following stepwise acidic pretreatment and alkaline fractionation". *Process Biochemistry*, **47**(4), 619-625.
- Yang, H.; Wang, K.; Wang, W. y Sun, R.-C. 2013. "Improved bioconversion of poplar by synergistic treatments with white-rot fungus *Trametes velutina* D10149 pretreatment and alkaline fractionation". *Bioresource Technology*, **130**, 578-583.
- Yáñez-S, M.; Rojas, J.; Castro, J.; Ragauskas, A.; Baeza, J. y Freer, J. 2013. "Fuel ethanol production from *Eucalyptus globulus* wood by autocatalized organosolv pretreatment ethanol-water and SSF". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **88**(1), 39-48.
- Zakaria, M.R.; Hirata, S. y Hassan, M.A. 2015. "Hydrothermal pretreatment enhanced enzymatic hydrolysis and glucose production from oil palm biomass". *Bioresource Technology*, **176**, 142-148.
- Zamani, A. 2015. Cap. 1 "Introduction to lignocellulose-based products". En: *Lignocellulose-based bioproducts*. Ed. Springer International Publishing Switzerland.
- Zhang, Z.; O'Hara, I.M. y Doherty, W.O. 2013. "Pretreatment of sugarcane bagasse by acidified aqueous polyol solutions". *Cellulose*, **20**(6), 3179-3190.
- Zhang, H. y Wu, S. 2014. "Efficient sugar release by acetic acid ethanol-based organosolv pretreatment and enzymatic saccharification". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**(48), 11681-11687.

- Zhang, H. y Wu, S. 2015. "Generation of lignin and enzymatically digestible cellulose from ethanol-based organosolv pretreatment of sugarcane bagasse". *Cellulose*, **22**(4), 2409-2418.
- Zhang, K.; Pei, Z. y Wang, D. 2016a. "Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review". *Bioresource Technology*, **199**, 21-33.
- Zhang, Z.; Harrison, M.D.; Rackemann, D.W.; Doherty, W.O. y O'Hara, I.M. 2016b. "Organosolv pretreatment of plant biomass for enhanced enzymatic saccharification". *Green Chemistry*, **18**(2), 360-381.
- Zhang, W.; Sathitsuksanoh, N.; Simmons, B.A.; Frazier, C.E.; Barone, J.R. y Renneckar, S. 2016c. "Revealing the thermal sensitivity of lignin during glycerol thermal processing through structural analysis". *RSC Advances*, **6**(36), 30234-30246.
- Zhao, H.; Jones, C.L.; Baker, G.A.; Xia, S.; Olubajo, O. y Person, V.N. 2009. "Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis". *Journal of Biotechnology*, **139**(1), 47-54.
- Zhao, X.; Zhang, L. y Liu, D. 2012. "Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose". *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **6**(4), 465-482.
- Zhong, Y.; Ruan, Z.; Zhong, Y.; Archer, S.; Liu, Y. y Liao, W. 2015. "A self-sustaining advanced lignocellulosic biofuel production by integration of anaerobic digestion and aerobic fungal fermentation". *Bioresource Technology*, **179**, 173-179.
- Zhu, M.-Q.; Wen, J.-L.; Su, Y.-Q.; Wei, Q. y Sun, R.-C. 2015. "Effect of structural changes of lignin during the autohydrolysis and organosolv pretreatment on *Eucommia ulmoides* Oliver for an effective enzymatic hydrolysis". *Bioresource Technology*, **185**, 378-385.
- Zhuang, X.; Wang, W.; Yu, Q.; Qi, W.; Wang, Q.; Tan, X.; Zhou, G. y Yuan, Z. 2016. "Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products". *Bioresource Technology*, **199**, 68-75.
- Zu, S.; Li, W.-z.; Zhang, M.; Li, Z.; Wang, Z.; Jameel, H. y Chang, H.-m. 2014. "Pretreatment of corn stover for sugar production using dilute hydrochloric acid followed by lime". *Bioresource Technology*, **152**, 364-370.

ANEXOS

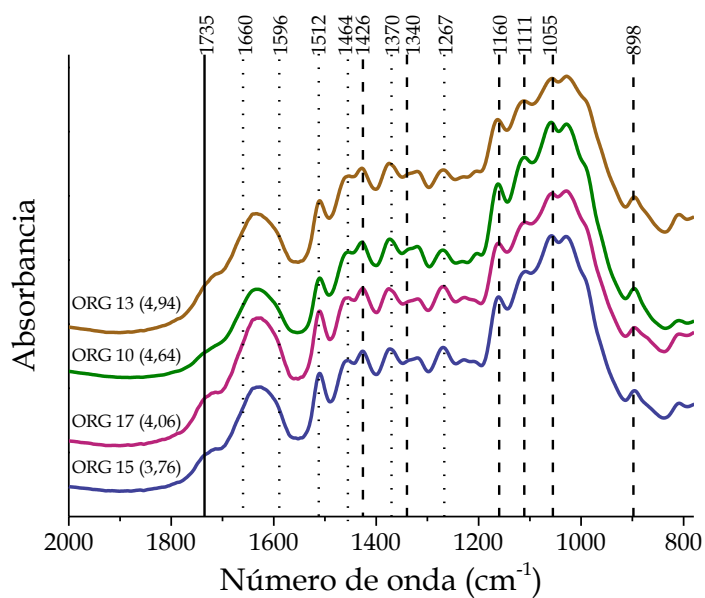
ANEXOS

Los anexos se encuentran divididos en tres partes donde se recogen los resultados de los siguientes análisis:

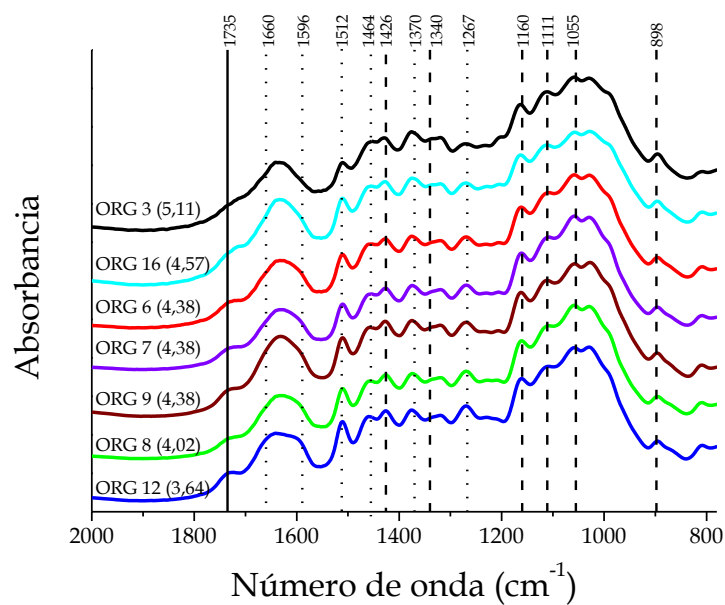
1. Los espectros FTIR de los sólidos deslignificados del diseño de experimentos organosolv.
2. La distribución de pesos moleculares de las ligninas precipitadas del diseño de experimentos organosolv.
3. La distribución de pesos moleculares de las ligninas precipitadas de los procesos organosolv y procesos secuenciales.

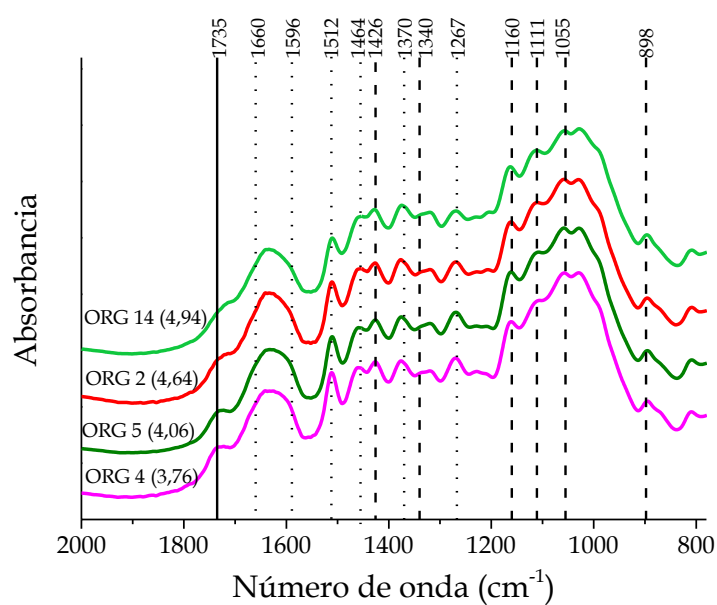
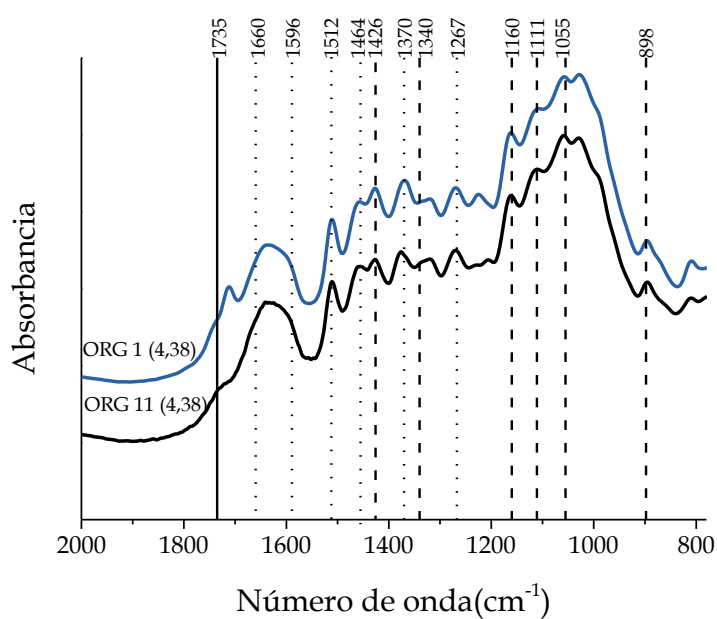
1) ESPECTROS FTIR SÓLIDOS DESLIGNIFICADOS: DISEÑO ORGANOSOLV

Sólidos deslignificados al 40 % de etanol



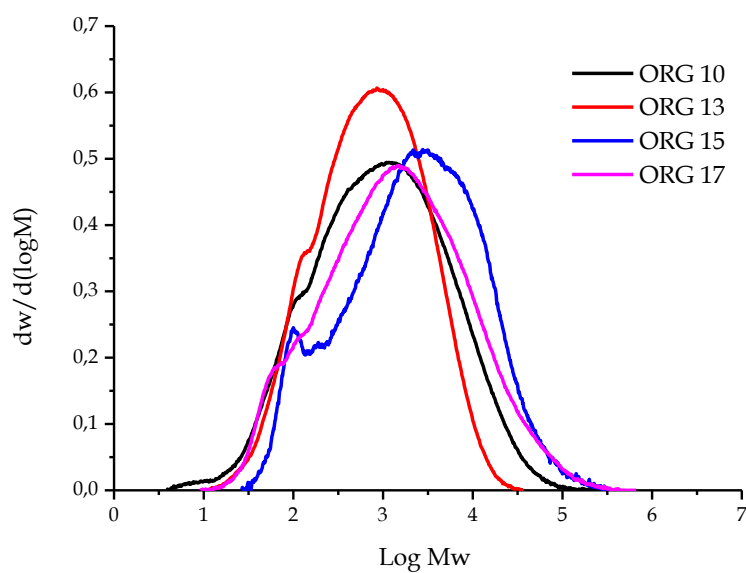
Sólidos deslignificados al 50 % de etanol



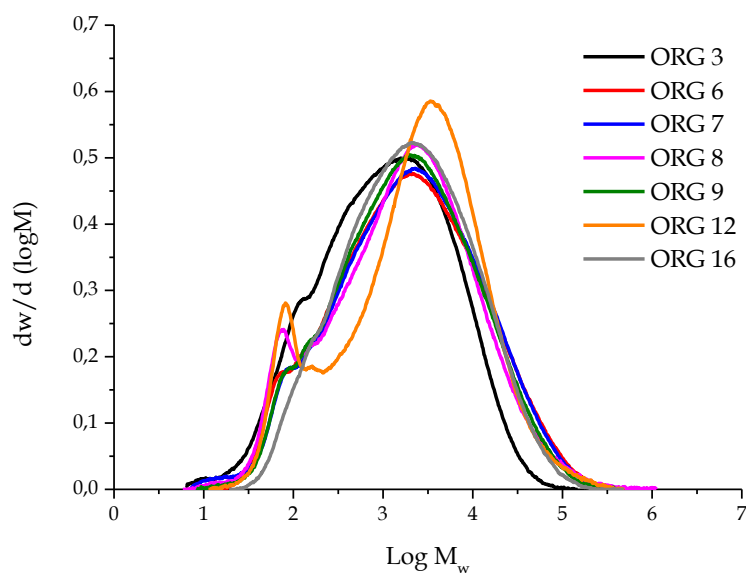
Sólidos deslignificados al 60 % de etanol**Sólidos deslignificados al 33 y 67 % de etanol**

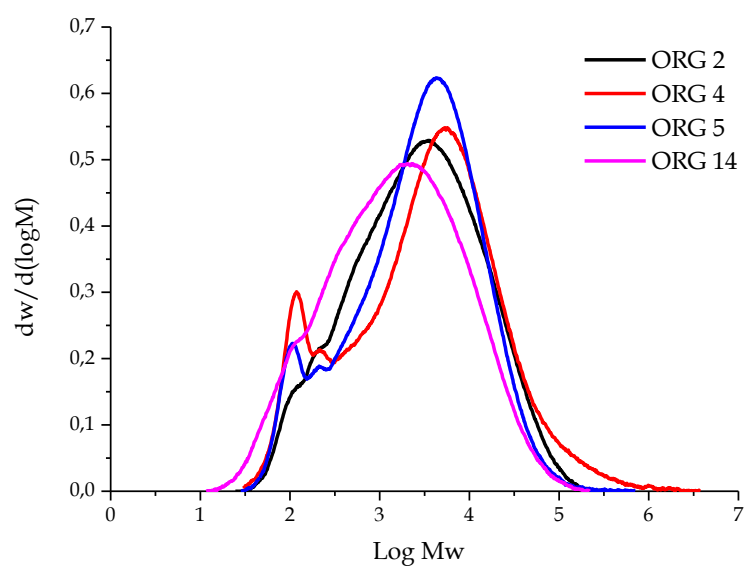
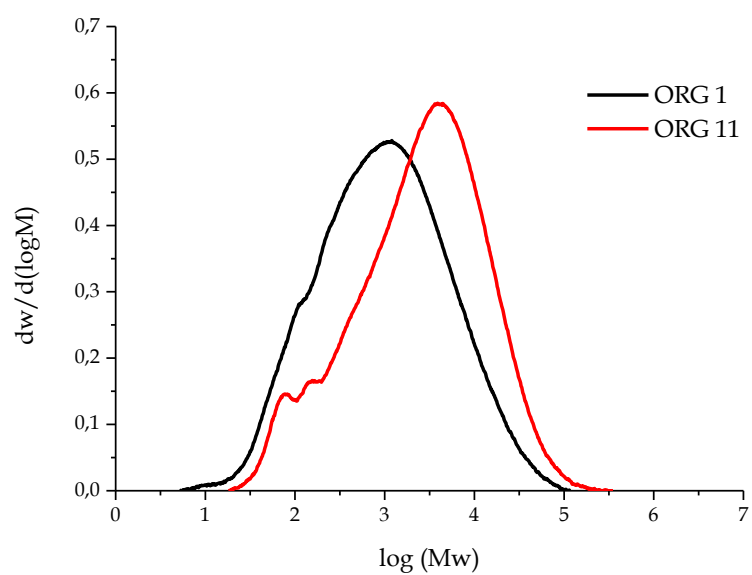
2) DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES: DISEÑO ORGANOSOLV

Ligninas obtenidas al 40 % de etanol



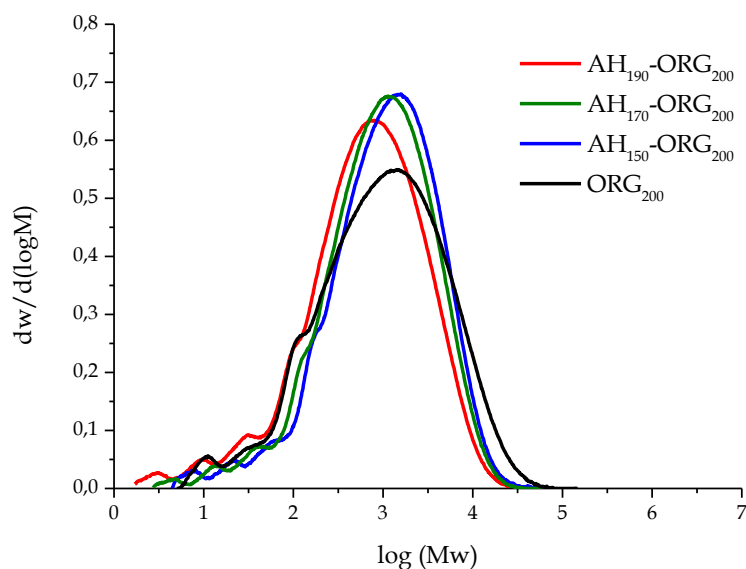
Ligninas obtenidas al 50 % de etanol



Ligninas obtenidas al 60 % de etanol**Ligninas obtenidas en condiciones estrellas: 33 y 67 % de etanol**

3) DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES: PROCESOS ORGANOSOLV Y PROCESOS SECUENCIALES

Ligninas procedentes del proceso organosolv autocatalítico (200 °C, 100 min y 50 % de etanol)



Ligninas procedentes del proceso organosolv ácido (185 °C, 75 min, 50 % de etanol y 1 % H_2SO_4)

